

Analyse chromosomaler Aberrationen
unter Einsatz von FISH-Techniken
nach Bestrahlung peripherer Lymphozyten mit Eisenionen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
- Dr. rer. nat. -

des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften,
Landschaftsarchitektur

an der

Universität Duisburg-Essen
Campus Essen

vorgelegt von

Markus Horstmann

geboren in
Essen

Oktober 2003

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Institut für Genetik der Universität Duisburg-Essen (Campus Essen) durchgeführt.

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Herr Prof. Dr. H. Esche

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. G. Obe

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. W.-U. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2004

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen und Begriffe.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VIII
 1. Einleitung	 1
1.1 Struktur des Erbmaterials.....	2
1.2 Zellzyklus.....	3
1.3 Chromosomenaberrationen (CA).....	6
1.3.1 Chromosomentypaberrationen (CSA).....	7
1.3.2 Chromatidentypaberrationen (CTA).....	8
1.4. Klassische Theorien zur Entstehung von CA.....	9
1.4.1 Bruch-Reunions-Hypothese nach Sax.....	9
1.4.2 Austausch-Hypothese nach Revell.....	9
1.5 Einheiten aus der Strahlenbiologie.....	10
1.5.1 Physikalische Einheiten.....	10
1.5.2 Relative Biologische Wirksamkeit (RBW).....	11
1.6 Ionisierende Strahlen.....	12
1.6.1 Elektromagnetische Strahlen.....	13
1.6.1.1 Gamma-Strahlen.....	13
1.6.1.2 Röntgenstrahlen.....	13
1.6.2 Partikelstrahlen.....	14
1.6.2.1 Alpha-Strahlen.....	14
1.6.2.2 Beta-Strahlen.....	14
1.6.2.3 Neutronen-Strahlen.....	14
1.6.2.4 Schwerionen-Strahlen.....	14
1.6.3 Kosmische Strahlen.....	15
1.7 Die Wirkung ionisierender Strahlen auf die Zelle.....	17
1.8 Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL).....	21
1.9 Analysetechniken.....	22
1.9.1 Giemsa-Färbung.....	22

1.9.2 Fluoreszenz-Färbung.....	22
1.9.3 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	24
1.9.3.1 24-Farben-FISH (mFISH).....	26
1.9.3.2 Viel-Farben-Bänderung (mBAND).....	26
1.9.3.3 Pan-Zentromer-Färbung	28
1.10 Analyse und Auswertung in mBAND	28
1.11 Gegenüberstellung von Giemsa-, mFISH- und mBAND-Technik.....	30
1.12 Ziele diese Arbeit.....	31
2. Material und Methoden	33
2.1 Mit Fe-Ionen <i>in vitro</i> bestrahlte PBL.....	33
2.2 Mit kosmischer Strahlung <i>in vivo</i> bestrahlte PBL	34
2.3 Sterile Arbeitsbedingungen.....	35
2.4 Kultivierung von PBL und Chromosomenpräparation	35
2.4.1 Standardkultur für PBL	36
2.4.2 Vorzeitige Chromosomen-Kondensation (PCC).....	36
2.5 Chromosomenpräparation.....	37
2.6 FISH und Giemsa.....	39
2.6.1 Verwendete DNA Sonden.....	39
2.6.2 Ausstattung.....	42
2.6.3 Material und Reagenzien.....	42
2.6.4 mFISH und mBAND.....	44
2.6.5 Hybridisierung mit einer Pan-Zentromer-Sonde.....	48
2.6.6 Giemsa-Färbung.....	49
2.7 Aufnahme und Auswertung der Präparate.....	50
2.7.1 Bildtechnische Arbeitsschritte	50
2.7.2 Kontrolle der einzelnen Fluoreszenz-Farben	50
2.7.3 Kontrolle der Falschfarben-Darstellung.....	51
2.7.4 Auswertung der CA und statistische Erfassung.....	51
2.7.5 Dosis-Effekt Beziehung	52
2.7.6 Bestimmung der relativen Bandenlänge in mBAND.....	52
2.7.7 Bruchpunktlokalisation und Bruchverteilung	53
2.7.8 Klassifizierung der CA.....	54
2.8 Bezugsquellenverzeichnis.....	55

3. Ergebnisse	57
3.1 Übersicht	57
3.2 Ein Auswertesystem für mBAND	58
3.2.1 Beispiele für CA und ihre Klassifizierung	63
3.2.1.1 Schemata für CA in mBAND	63
3.2.1.2 CA in mBAND	64
3.2.2 Auswertetabelle	65
3.3 Beispiele für CA in FISH	65
3.4 Relative Bandenlängen von Chromosom 5 in mBAND	70
3.5 Bruchhäufigkeiten in Chromosom 5	71
3.6 Die Länge interstitieller Fragmente	72
3.7 Lokalisation interstitieller Fragmente in Chromosom 5	74
3.8 CA nach Bestrahlung mit Fe-Ionen mit 200 MeV/n und 500 MeV/n	76
3.9 Vergleiche aberranter Chromosomen mit aberranten Zellen	79
3.10 Vergleich mBAND, mFISH, Pan-Zentromer-Färbung	80
3.11 Vergleiche von Interchangen und Intrachangen	83
3.12 Verteilung von CA in PBL von Astronauten	87
4. Diskussion	89
4.1 Methodik	89
4.2 CA in Chromosom 5	91
4.2.1 Bandenlängen und interstitielle Fragmente	92
4.2.2 Bruchereignisse	94
4.2.3 Intrachange und Interchange	96
4.3 CA in PBL von Astronauten	96
5. Zusammenfassung	102
6. Literaturverzeichnis	104
7. Danksagung	117
8. Lebenslauf	118
9. Erklärung	

ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFE

Englische Ausdrücke sind kursiv gedruckt

Aqua dest.	(lat.: Aqua destillata = destilliertes Wasser)
Biotin-dUTP	Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat
C-1' bis C-5'	Bezeichnung der Kohlenstoffatome in der Desoxyribose
CA	Chromosomenaberration
CSA	Chromosomentypaberration
CSA+CTA	Chromosomen- und Chromatidentypaberrationen (in einer Zelle)
CTA	Chromatidentypaberration
Cy TM 5	5-NN'-Diethyl-tetramethylindodicarbocyanin
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DEAC	Diethylaminocoumarin
DIZ	Dizentrisches Chromosom
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
ESB	Einzelstrangbruch
FISH	<i>fluorescence in situ hybridization</i> , Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
G-Phasen (0/1/2)	<i>Gap</i> -Phasen
Interchange	Austausche zwischen mindestens zwei Chromosomen
Intrachange	Austausche und Veränderungen innerhalb eines Chromosoms
ISIS	<i>in situ imaging software (METASYSTEMS[©])</i>
mBAND	<i>multicolor banding fluorescence in situ hybridization</i>
mFISH	<i>multicolor fluorescence in situ hybridization</i>
Medium	McCoy's 5A-Medium, einschließlich Antibiotika
PBL	<i>peripheral blood lymphocytes</i> / Lymphozyten des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCC	<i>Premature chromosome condensation</i>
PHA	Phytohämagglutinin
SCE	<i>Sister chromatid exchange</i> , Schwesterchromatidenaustausch
SO TM	Spectrum Orange TM (Vysis)
SORB	<i>selected observed residual breakpoint</i>
S-Phase	Synthesephase
SSC	<i>Sodium saline citrate</i>
TR [®]	Texas Red (Molecular Probes [®] Inc.)
TRITC	Tetramethylrhodamin-isothiocyanat
Vollmedium	Medium mit 10% FKS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Zellzyklus-Schema.....	3
Abb. 2: Abhängigkeit von CA und Strahlendosis bei der Entstehung von DIZ und B''	20
Abb. 3: Lichtweg in einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop.....	23
Abb. 4: Schema einer <i>in situ</i> Hybridisierung	24
Abb. 5: Direkte und indirekte fluorochromale Markierung	25
Abb. 6: Bandendarstellung in mBAND	27
Abb. 7: Hybridisierungs-Schema für mFISH.....	41
Abb. 8: Hybridisierung-Schema für mBAND	41
Abb. 9: Chromosom 5 mit Chromatidendifferenzierung in Falschfarben-Darstellung in mBAND	50
Abb. 10: Schemata für CA in mBAND	63
Abb. 11: CA in mBAND.....	64
Abb. 12: CA in mBAND nach Bestrahlung mit Fe-Ionen (500 MeV/n).....	66
Abb. 13: CA in mFISH nach Bestrahlung mit 1 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n).....	68
Abb. 14: CA in Pan-Zentromer-Färbung nach Bestrahlung mit 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n).....	69

Abb. 15: Prozentuale Bandenlängen von Chromosom 5 in mBAND	70
Abb. 16: Bruchverteilung pro Bande bezogen auf die jeweilige Bandenlänge. Zusammenfassung der Werte für Bestrahlungen mit 0,5 Gy, 0,75 Gy, 1 Gy, 3 Gy und 4 Gy	71
Abb. 17: Relative Länge interstitieller Fragmente, die an CA beteiligt waren, nach Bestrahlung mit 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n).....	72
Abb. 18: Relative Länge azentrischer interstitieller Fragmente, die an Translokationen beteiligt waren, nach Bestrahlung mit 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n)	73
Abb. 19: Relative Länge azentrischer interstitieller Fragmente, die an Deletionen beteiligt waren, nach Bestrahlung mit 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n)	73
Abb. 20: Lokalisationsschema für interstitielle Fragmente in Chromosom 5, bezogen auf Inversionen, Insertionen, azentrische Fragmente und zentrische Translokationen nach Bestrahlung mit 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n)	74
Abb. 21: Anzahl der Bruchereignisse in aberranten Chromosomen 5 nach Bestrahlungen mit 0,5 Gy, 0,75 Gy, 1 Gy, 3 Gy und 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n).....	76
Abb. 22: Vergleich der Bruchverteilung in aberranten Chromosomen 5 nach Bestrahlung mit 0,5 Gy und 1 Gy Fe-Ionen (200 MeV/n und 500 MeV/n)	77
Abb. 23: Vergleich von aberranten Zellen, Fragmenten und Translokationen in mBAND nach Bestrahlung mit 0,5 Gy und 1 Gy Fe-Ionen (200 MeV/n und 500 MeV/n)	78
Abb. 24: Vergleich von aberranten Chromosomen 5 und aberranten Zellen nach Bestrahlungen mit 0,5 Gy, 0,75 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n).....	79

Abb. 25: Anteil aberranter Chromosomen 5 in mBAND/mFISH nach Bestrahlungen mit 1 Gy und 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n)	80
Abb. 26: Methodenvergleich mBAND/mFISH für einfache/komplexe Interchange nach Bestrahlung mit Fe-Ionen (500 MeV/n)	81
Abb. 27: DIZ von Chromosom 5, untersucht mit Pan-Zentromer-Färbung und mBAND	82
Abb. 28: Einfache und komplexe Interchange mit Beteiligung von Chromosom 5 nach Bestrahlungen mit 1 Gy und 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n).....	83
Abb. 29: Intra-arm Intrachange und inter-arm Intrachange in Chromosom 5 nach Bestrahlungen mit 1 Gy und 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n)	84
Abb. 30: Intra- und Interchange sowie terminale Fragmente nach Bestrahlungen mit 1 Gy und 4 Gy mit Fe-Ionen (500 MeV/n).....	85
Abb. 31: Quotientenvergleich von komplexen zu einfachen Interchanges (C-Quotient), intra- zu inter-arm Intrachangen (G-Quotient) und einfache Interchanges zu Intrachangen (F-Quotient) für Chromosom 5 nach Bestrahlungen mit 1 Gy und 4 Gy Fe-Ionen	86
Abb. 32: Flug zur internationalen Raumstation ISS mit einer Aufenthaltsdauer von neun Tagen. Zusammengefasste Daten für aberrante Zellen aus Untersuchungen mit Giemsa-Färbung, mBAND und mFISH	87
Abb. 33: Flug zur internationalen Raumstation ISS mit einer Aufenthaltsdauer von fünf Monaten. Zusammengefasste Daten für aberrante Zellen aus Untersuchungen mit Giemsa-Färbung, mBAND und mFISH	88

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Physikalische Einheiten in der Strahlenbiologie	10
Tab. 2: Radiobiologische Schäden und ihr zeitliches Auftreten.....	17
Tab. 3: Auswirkung ionisierender Strahlung auf verschiedene biologische Ebenen.....	19
Tab. 4: Methodenvergleich Giemsa, mBAND und mFISH für CA.....	30
Tab. 5: Anzahl untersuchter Zellen pro Dosis und Untersuchungsmethode.....	34
Tab. 6: Anzahl untersuchter PBL und Methoden, für einen Taxiflug zur Raumstation ISS mit einer Aufenthaltsdauer von neun Tagen.....	34
Tab. 7: Anzahl untersuchter PBL und Methoden, für Astronauten eines Langzeit- fluges zur Raumstation ISS mit einer Aufenthaltsdauer von fünf Monaten	35
Tab. 8: Anregungs- und Emissionsmaxima für FISH-Fluorochrome.....	40
Tab. 9: Nomenklaturschlüssel für die Klassifizierung von CA in mBAND.....	51
Tab. 10: Auswertetabelle für mBAND. Beispiele aus Abb. 10 (a-d) und Abb. 11 (e-g) sind eingefügt	65
Tab. 11: Prozentuale Bandenlängen von Chromosom 5 in mBAND einschließlich ihrer Standardabweichung.....	70
Tab. 12: Dispersionsindex und Brüche in aberranten Chromosomen 5 nach Bestrahlung mit Fe-Ionen (200 MeV/n und 500 MeV/n)	78

1. Einleitung

Mutationen und die damit verbundenen Risiken sind ständig im Blickfeld moderner Forschungen. Zeigen sich die Mutationen auf chromosomaler Ebene in Form von Chromosomenaberrationen (CA), so lassen sich nach Auswertung mikroskopischer Analysen Krebsrisikoabschätzungen vornehmen. Die Methoden zur Analyse von CA sind zwischenzeitlich mit Hilfe neuer computerunterstützter Hybridisierungstechniken enorm erweitert worden und gestatten einen wesentlich differenzierteren Einblick in die morphologischen Veränderungen der Chromosomen. Bereits seit einiger Zeit wird darüber diskutiert, ob CA induzierende Agenzien eine für sie typische „Signatur“ oder einen „Fingerabdruck“ in Form von speziellen CA im menschlichen Genom hinterlassen (BRENNER *et al.*, 2001).

Im Rahmen der Weltraumforschung und im Hinblick auf zukünftige Langzeitmissionen werden Untersuchungen kosmischer Strahlenpartikel, die auf der Erde nur künstlich erzeugt werden können, interessant. Schwere Eisenionen ($^{56}\text{Fe}^{26+}$ -Ionen, fortan Fe-Ionen genannt) gehören zu diesen kosmischen Teilchen. Ihre hohe biologische Wirksamkeit sowie ihre Fähigkeit, beim Auftreffen auf Materie Sekundärstrahlung zu erzeugen, macht sie für Biologen, Mediziner und Physiker gleichermaßen interessant.

Wegen der physikalischen Eigenschaften der Ionenstrahlung sind massive Schädigungen in den Chromosomen zu erwarten. Mehrfache Brüche, Fragmente sowie Veränderungen zwischen und innerhalb der Chromosomen können mit Hilfe verschiedener Fluoreszenztechniken sichtbar gemacht und klassifiziert werden. Die Eigenschaften von schweren Ionen werden seit einiger Zeit im Sinne des Strahlenschutzes und der Strahlentherapie untersucht. Untersuchungen, die moderne Methoden der Molekularbiologie, wie etwa die *Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)* in ihren Varianten mFISH und mBAND für die Analyse der Strahleneffekte schwerer Ionen einbeziehen, sind bislang kaum oder nicht verfügbar. In dieser Arbeit wird eine Untersuchungsreihe mit mBAND und mFISH vorgestellt. In ihr sollen Auswirkungen von *in vitro* Bestrahlungen mit Fe-Ionen in menschlichen Lymphozyten des peripheren Blutes (engl.: *peripheral blood lymphocytes*, PBL) auf chromosomaler Ebene vorgestellt werden, damit möglicherweise ein entsprechender „Fingerabdruck“ gefunden werden kann. Die Analyse von CA in den PBL von Astronauten eines kurzen und eines langen Weltraumaufenthaltes auf der internationalen Raumstation ISS soll ergänzend als *in vivo* Vergleich herangezogen werden.

1.1 Struktur des Erbmaterials

Die Desoxyribonukleinsäure (DNS, engl.: *Desoxyribonucleic acid*, DNA) ist die entscheidende subzelluläre Struktur, die von ionisierenden Strahlen geschädigt werden kann. In ihr sind alle genetischen Informationen enthalten, die von der Zelle und letztlich vom Gesamtorganismus zum Leben benötigt werden. Weil diese Informationen pro Zelle nur zweimal vorhanden sind, sorgen zahlreiche Mechanismen für die Reparatur entstandener Schäden. Der verursachte Schaden kann ordnungsgemäß behoben werden (Repair) oder auch nicht (Misrepair). In letzterem Fall ist es nicht mehr möglich, die ursprüngliche Struktur der DNA herzustellen. In diesem Zusammenhang sei kurz auf die Wahl des Begriffes „Misrepair“ hingewiesen, der in sich zwar widersprüchlich ist, aber trotzdem allgemeine Verwendung findet.

Die molekularen Schäden an der DNA können auf chromosomaler Ebene erkennbar werden und als Aberrationen, etwa als Ringchromosomen, dizentrische Chromosomen (DIZ) oder Fragmente, in einem Mikroskop analysiert werden.

Die DNA ist ein Biopolymer, dessen Bausteine (Nukleotide) aus dem Zucker Desoxyribose, einem Phosphatrest und einer Purin- oder Pyrimidinbase bestehen. Als Nukleoside bezeichnet man die Verbindung von Zucker und Base. Der Name des Nukleosids leitet sich von der Base ab. Zum Beispiel enthält Desoxythymidin die Pyrimidinbase Thymin. Zucker und Phosphat bilden das polare Rückgrat der DNA. Die Polarität des DNA-Einzelstrangs wird mit 3' für die Bindungsstelle des folgenden Nukleotids am Kohlenstoffatom C-3' des Zuckers und mit 5' für die Bindungsstelle des Phosphats am C-5' des Zuckers bezeichnet.

Zwei antiparallel angeordnete DNA-Einzelstränge bilden einen DNA-Doppelstrang, der über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen zusammengehalten wird. Es paaren sich Adenin und Thymin sowie Cytosin und Guanin (WATSON und CRICK, 1953). Unterbrechungen in der Kontinuität der DNA-Stränge werden als Brüche oder Bruchereignisse verstanden. Einzelstrangbrüche (ESB), Doppelstrangbrüche (DSB), Basenschäden, Basenverluste, falsche Basenverbindungen oder Strukturänderungen können durch den Einfluss mutagener Agenzien entstehen und sekundär, etwa in Form von Deletionen, am mikroskopisch sichtbaren Chromosom erfasst werden.

1.2 Zellzyklus

Eukaryote Zellen vermehren sich in einem zyklischen Prozess aus Wachstum und Teilung. Der Zellzyklus gliedert sich in die Interphase und die Teilungsphase. Bei der Zellteilung muss sichergestellt werden, dass alle wesentlichen Zellbestandteile gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden. Von elementarer Bedeutung ist die Weitergabe identischer Kopien der DNA.

Die Interphase wird eingeteilt in zwei Gap-Phasen (G-Phasen), in denen keine DNA-Synthese nachweisbar ist, und in eine zwischen G1- und G2-Phase liegende Synthese-Phase (S-Phase), in der das genetische Material verdoppelt wird (Abb.1). Teilungsinaktive Zellen, wie etwa Lymphozyten oder Leberzellen, befinden sich in einer Art Ruhephase (G0-Phase), können aber wieder in den Zellzyklus eintreten.

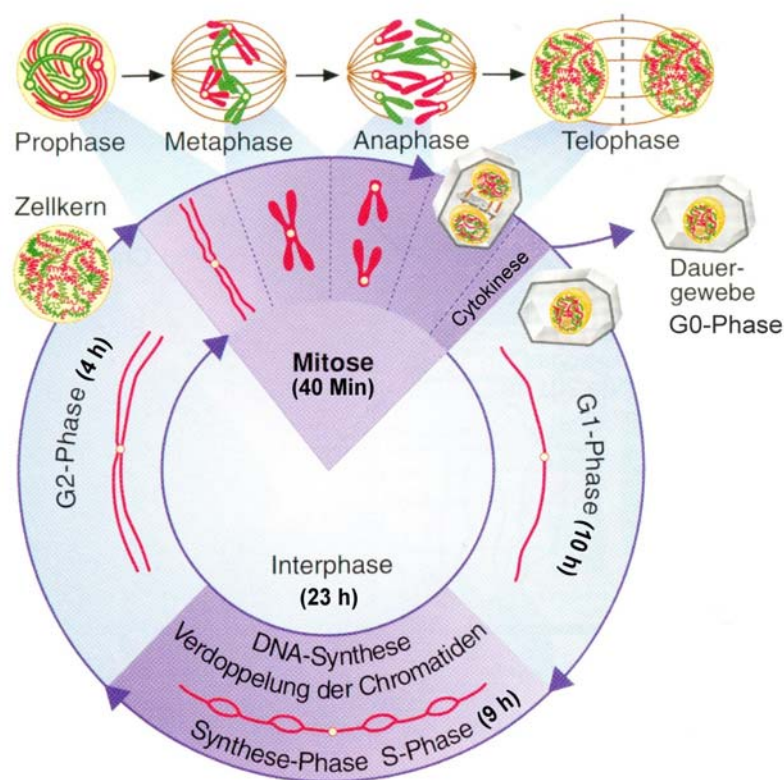


Abb. 1: Zellzyklus-Schema. Quelle (verändert): BAYRHUBER H., KULL U. (Hrsg., 1998). Linder Biologie, 21. Aufl., S. 35. (Mit freundlicher Genehmigung des Schroedel Verlages im Bildungshaus Schroedel Diesterweg Bildungsmedien GmbH & Co KG, Hannover).

Die G1-Phase ist die zeitlich variable Wachstumsphase der Zelle, in der sie biosynthetisch sehr aktiv ist. Für den allgemeinen Stoffwechsel notwendige und gewebetypische Proteine werden gebildet. Nach der G1-Phase tritt die Zelle in die S-Phase ein. In der S-Phase wird aus dem Chromosom, das bis zu diesem Zeitpunkt nur aus einer Chromatide mit jeweils einem DNA-Molekül besteht, ein Chromosom mit zwei Chromatiden. Dieser Vorgang wird Replikation genannt. Bei der Replikation wird der in der Chromatide enthaltene DNA-Doppelstrang zwischen den Basen längs aufgeteilt, und an jedem der beiden Einzelstränge wird ein neuer Einzelstrang synthetisiert. Der neue Doppelstrang besteht also jeweils aus einem alten und einem neuen Strang, der Mechanismus ist semikonservativ.

Die Replikation verläuft nicht kontinuierlich von einem Ende des Chromosoms zum anderen. Dies würde viel zu lange dauern. Stattdessen gibt es eine Vielzahl von Startpunkten, so dass die DNA abschnittsweise, aber an vielen verschiedenen Stellen gleichzeitig, repliziert wird. Es bilden sich Replikationsblasen (Abb. 1), an denen die DNA aufgetrennt wird und die beiden neuen Stränge synthetisiert werden. Das Enzym für die Replikation ist die DNA-Polymerase, die in 5'-3'-Richtung freie Nukleotide an eine schon vorhandene, neu synthetisierte Nukleotidkette anhängt. Aufgrund der Antiparallelität der beiden DNA-Einzelstränge kann nur ein Strang durchgehend synthetisiert werden. Dieser Strang wird *leading strand* genannt. Der andere *lagging strand* wird mit Hilfe von OKAZAKI-Fragmenten stückweise und in Bezug auf das Fortschreiten der Replikationsgabel „rückwärts“ repliziert.

Die Replikation verläuft in den Replikons. Zwischen 10 und 100 DNA-Replikons bilden chromosomale Replikationseinheiten. Alle DNA-Replikons einer chromosomalen Replikationseinheit beginnen gleichzeitig mit der Replikation (LAU und ARRIGHI, 1981). Euchromatische Abschnitte mit aktiven Genen werden früher repliziert als heterochromatische Abschnitte mit inaktiven Genen oder hochrepetitiven genleeren Sequenzen.

Wenn alle Chromosomen durchgängig repliziert sind, erfolgt der Übergang in die G2-Phase. Die Zelle wächst weiter und bereitet sich auf die nachfolgende Mitose vor. Nach Überschreiten eines Restriktionspunktes tritt die Zelle in die Mitose ein, in der die Verteilung identischer Kopien der DNA erfolgt.

Die Mitose wird unterteilt in Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase mit anschließender Cytokinese. Lichtmikroskopisch erkennbar beginnt in der Prophase die Kondensation des relativ homogenen Chromatins. Es kondensiert sich zu einzelnen fädigen Strukturen - den Chromosomen. Der Nukleolus löst sich auf, und gegen Ende der Prophase zerfällt die Kernhülle. Die Chromosomen werden zunehmend dicker und kürzer. Jedes Mitose-Chromosom besteht aus zwei Chromatiden, die am Zentromer verbunden sind. Jede Chromatide enthält einen durchgehenden DNA-Doppelstrang, der mit basischen Histon-Proteinen und Nicht-Histon-Proteinen assoziiert ist. Diese Assoziation mit Proteinen ermöglicht eine Verpackung der DNA in mehreren Stufen bis hin zu einer starken Kondensation der Chromosomen in der Mitose. Von den Polen der Zelle rücken die Zentrosomen auseinander, wobei sie offenbar von den immer länger werdenden Spindelfasern auseinander geschoben werden. Bündelweise angeordnete Mikrotubuli bilden diese Spindelfasern. Diese können sich am Kinetochor, einer Struktur des Zentromers auf jeder Chromatide, anheften.

In der Metaphase werden die Chromosomen mit Hilfe des Spindelapparates über eine Pendelbewegung in der Äquatorialebene angeordnet. Die Ebene in der Mitte zwischen den Spindelpolen wird auch als Äquatorialplatte bezeichnet.

Verantwortlich für die Schwesterchromatidenpaarung ist der Multiproteinkomplex Cohesin, der während der Replikation eingebaut wird und einem kontrollierten zellzyklusabhängigen Abbau unterliegt (ALEXANDRU *et al.*, 1999). Die Anaphase beginnt mit dem Anaphasesprung: Unter Abbau des Cohesins erfolgt die vollständige Trennung der beiden Chromatiden, die als Tochterchromosomen bezeichnet werden. Die Tochterchromosomen werden unter Abbau der Mikrotubuli des Spindelapparates mit dem Kinetochor voran zu den Zellpolen transportiert. Gleichzeitig werden die Pole auseinander geschoben, so dass sich die Zelle streckt.

Die Telophase beginnt, wenn die Chromosomen die Pole erreicht haben. Die Chromosomen dekontensieren und bilden das Chromatin, in dem sie nicht mehr einzeln zu erkennen sind. Eine neue Kernhülle entsteht unter dem Einfluss der Chromosomen, und die Nukleolus-organisierenden-Regionen (NOR) bauen die Nukleoli wieder auf. Die Zellteilung wird mit der Zytokinese abgeschlossen. Die Zelle wird unter Beteiligung von Aktin und Myosin zwischen den beiden Kernen durchgeschnürt. Nach Bildung der Tochterzellen ist die Teilungsphase abgeschlossen.

1.3 Chromosomenaberrationen (CA)

Als CA werden allgemein strukturelle Veränderungen von Chromosomen bezeichnet. Sie entstehen beispielsweise, wenn die DNA bricht und die daraus resultierenden Fragmente ausgetauscht oder nicht ordnungsgemäß wieder zusammengeführt werden (PFEIFFER *et al.*, 2000). Dieser molekulare Schaden kann auf chromosomaler Ebene sichtbar werden. Die Schädigungen können spontan sein oder mit physikalischen, chemischen oder biologischen Mutagenen induziert werden.

Ionisierende Strahlen zählen zu S-Phase unabhängigen Mutagenen und sind stark chromosomenbrechend (OBE *et al.*, 1992). Die entstehenden DSB sind Primärschäden und können die Ursache für CA sein (NATARAJAN und OBE, 1996; PFEIFFER *et al.*, 2000). Bruchereignisse finden meist im Euchromatin statt und können in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus mit mutagenen Agenzien induziert werden. Dementsprechend führt dies zu unterschiedlichen Arten von CA. Bruchereignisse, die in der G1-Phase induziert werden, duplizieren sich als Schäden in der S-Phase. In der nachfolgenden Metaphase sind diese Schäden an beiden Chromatiden des Chromosoms an gleicher Stelle sichtbar. Diese CA werden Chromosomentypaberrationen (CSA) genannt. Brüche, die in der G2-Phase induziert werden, können jeweils eine Chromatide betreffen und führen zu Chromatidentypaberrationen (CTA). In der S-Phase können CTA oder CSA entstehen abhängig davon, ob der geschädigte Bereich bereits repliziert war oder nicht. Aufgrund der Schwesterchromatidenpaarungen im Metaphasechromosom kann es bei CTA zu charakteristischen Austauschen kommen (SAVAGE, 1976).

S-Phase abhängige Mutagene können nicht selbständig DSB induzieren. In diesen Fällen ist bereits die Anlagerung des Mutagens der Primärschaden und der DSB der Sekundärschaden (BENDER *et al.*, 1974). Die S-Phase ist in diesem Fall notwendig, damit die CA zur Darstellung kommen. Bei Verabreichung des Mutagens in der G1-Phase werden in der folgenden Mitose CTA gefunden.

CA, die aus mindestens drei Bruchereignissen in mindestens zwei Chromosomen bestehen, werden als Komplexe oder komplexe CA bezeichnet (SAVAGE und SIMPSON, 1994a; SAVAGE und TUCKER, 1996). In vielen Untersuchungen haben sich drei Sachverhalte herausgestellt (SAVAGE, 1996):

1. Mehr als 90% der Bruchereignisse rekonstruieren und zeigen somit anschließend keine Änderung in der Chromosomenmorphologie.

2. Weil jedes Bruchereignis nur eine begrenzte Zeit bestehen bleibt, ist die Entstehung von Austauschen abhängig von der Zeit und der räumlichen Nähe eines weiteren Bruchereignisses. Repair und Misrepair konkurrieren.
3. Die Häufigkeit des Auftretens von unvollständigen Austauschen ist von der Ionisationsdichte oder der Phase des Zellzyklus abhängig. Menschen, die eine signifikante Erhöhung von CA besitzen, sind einem erhöhten Krebsrisiko ausgesetzt (HAGMAR *et al.*, 1994; BONASSI *et al.*, 1995; BONASSI *et al.*, 2000).

1.3.1 Chromosomentypaberrationen (CSA)

Von einer intrachromosomalen Aberration (engl.: *Intrachange*) wird bei den CSA gesprochen, wenn nur ein Chromosom beteiligt ist. Beispiele:

- a. Terminale Deletion (B''): Es entsteht ein verkürztes Chromosom und ein azentrisches Fragment.
- b. Intra-arm/inter-arm Intrachange: Veränderungen innerhalb oder zwischen den einzelnen Armen eines Chromosoms, die beide Chromatiden gleichzeitig betreffen, wie etwa
 - Inversionen, in denen Chromosomenabschnitte um 180° gedreht sind; perizentrische Inversionen enthalten ein Zentromer, parazentrische Inversionen enthalten kein Zentromer.
 - zentrische Ringchromosomen, in denen das zentrische Chromosomenstück an seinen Bruchenden zu einem Ring fusioniert ist. Die beiden verbleibenden Fragmente können ein B'' bilden.
- c. Interstitielle Deletion: Ein Mittelstück geht dem Chromosom verloren. Eine Sonderform stellen die „*Double Minutes*“ dar, winzige Ringe ohne Zentromer. Interstitielle Deletionen ohne Ringschluss sind im Lichtmikroskop nicht von B'' zu unterscheiden (siehe a).

Von einer interchromosomalen Aberration (engl.: *Interchange*) wird bei den CSA gesprochen, wenn mindestens zwei Chromosomen beteiligt sind. Beispiele:

- a. DIZ: Entstehen unter Verlust der Telomere an zwei Chromosomen. Zusätzlich gehören entweder ein fusioniertes Fragment oder zwei B'' dazu. Weitere Formen wären Aberrationen unter Beteiligung von mehr als zwei Chromosomen, zum Beispiel polyzentrische Chromosomen.

- b. Reziproke Translokation: Symmetrische wechselseitige Austausche von terminalen Chromosomenfragmenten. Reziproke Translokationen werden auch als „vollständige“ Translokationen bezeichnet.
- c. Einseitige Translokationen: Bei zwei terminalen Fragmenten von zwei verschiedenen Chromosomen fusioniert nur ein Fragment mit dem anderen Chromosom. Einseitige Translokationen werden auch als „unvollständige“ Translokationen bezeichnet.

1.3.2 Chromatidenentypaberrationen (CTA)

Von einem Intrachange wird bei den CTA gesprochen, wenn nur ein Chromosom beteiligt ist. Beispiele:

- a. Bruch einer Chromatide mit Fragment (B').
- b. Intra-arm/inter-arm Intrachange: Veränderungen innerhalb oder zwischen den einzelnen Armen eines Chromosoms, wie Inversionen in einer Chromatide.
- c. Isochromatidenbruch: Beide Chromatiden wurden auf gleicher Höhe unabhängig voneinander, gebrochen. Isochromatidenbrüche sind nicht von terminalen Deletionen zu unterscheiden.
- d. Interstitielle Deletion: Nur eine Chromatide ist von dem Verlust betroffen. Sonderform: „*Single Minute*“.
- e. Dublikationsdeletionen: Interstitielle Deletion für die eine Chromatide, Insertion eines DNA-Abschnittes für die andere Chromatide.

Die Schwesterchromatidenpaarung wird für diesen Abschnitt aufgehoben.

Von einem Interchange wird bei den CSA gesprochen, wenn mindestens zwei Chromosomen beteiligt sind. Beispiele:

- a. Quadriradiale Chromosomen (RB'): Chromatidenfragmente, die entweder fusioniert sind oder die an das Chromatidenbruchende des jeweilig anderen Chromosoms restituiert sind.
- b. Triradiale Chromosomen (RB'/B''): Die Chromatiden der Chromosomen fusionieren und deren Fragmente sind als B'' zu sehen.
- c. Komplexe Aberrationen mit Beteiligung mehrerer Chromosomen (RB'-Komplex).

1.4 Klassische Theorien zur Entstehung von CA

1.4.1 Bruch-Reunions-Hypothese nach Sax

Sax geht davon aus, dass ein Bruch die Voraussetzung für eine CA darstellt („breakage first“). Er ist der Auffassung, dass nach einem Bruch ein Fragment entsteht und nach zwei Brüchen ein Austausch möglich ist (SAX, 1938).

Nach Sax gibt es drei mögliche Reaktionen der Bruchenden:

- a. Restitution/Repair: Der Ursprungszustand wird wieder hergestellt. Es treten keine strukturellen Änderungen auf.
- b. Stabilisierung: Die Bruchenden werden stabilisiert und erhalten die gleichen Eigenschaften wie Telomere. Bei mikroskopischer Untersuchung sind Fragmente erkennbar.
- c. Reunion/Misrepair: Wenn zwei primäre Brüche zeitlich und räumlich nahe beieinander auftreten, können die entstehenden Bruchenden in verschiedener Weise miteinander fusionieren und Austauschaberrationen bilden.

1.4.2 Austausch-Hypothese nach Revell

Revell nimmt an, dass Brüche und Austausche immer auf Läsionen beruhen, die keine Brüche sind und dass immer zwei dieser Läsionen nötig sind, um sowohl Brüche als auch Austausche zu erzeugen. Das primäre Ereignis ist eine instabile Läsion. Treten zwei Läsionen nahe beieinander auf, können sie an Austauschprozessen teilnehmen. Bei unvollständigem Austausch kommt es zu Diskontinuitäten in der chromosomalen Struktur und es entstehen Brüche. Vollständige Austausche führen zu den bekannten Austauschfiguren (REVELL, 1974).

1.5 Einheiten aus der Strahlenbiologie

1.5.1 Physikalische Einheiten

Energiedosis		
SI-Einheit	alte Einheit	Umrechnung
Gray (Gy) 1 Gy = 1 J/kg	Rad (rad)	1 rad = 0,01 Gy 1 Gy = 100 rad
<p>Benannt nach Louis Harold Gray, 1905-1965, englischer Physiker. Dabei besitzen ionisierende Strahlen eine Energiedosis von 1 Gray, wenn pro Kilogramm beliebiger Materie eine Energie von 1 Joule übertragen wird. Weil die Energiedosis nicht direkt messbar ist, wird sie aus der Energiedosis der Luft unter Einbeziehung des materialspezifischen Absorptionskoeffizienten berechnet. Oberhalb von 1 MeV gibt es hinsichtlich des Absorptionsvermögens der einzelnen Materialien kaum noch Unterschiede.</p> <p>Energiedosis (D) = Energie / Masse</p>		
Äquivalentdosis		
SI-Einheit	alte Einheit	Umrechnung
Sievert (Sv) 1 Sv = 1 J/kg	Rem (rem)	1 rem = 0,01 Sv 1 Sv = 100 rem
<p>Benannt nach Rolf M. Sievert, 1896-1966, schwedischer Physiker. Dieser Dosisbegriff berücksichtigt die von der jeweiligen Strahlenart abhängigen Ionisationsdichten. Die Äquivalentdosis ist das Produkt aus der Energiedosis und einem effektiven dimensionslosen Qualitätsfaktor. (H) = D x q</p> <p><u>Beispiele für den effektiven Qualitätsfaktor:</u></p> <p>Alpha-Strahlen, schwere Ionen: q = 20</p> <p>Neutronen 10-100 keV: q = 10</p> <p>Röntgenstrahlen: q = 1</p>		
Linearer Energie Transfer		
SI-Einheit	alte Einheit	Umrechnung
Jm ⁻¹	LET (keVµm ⁻¹)	1 keVµm ⁻¹ = 1,6 x 10 ⁻¹⁰ Jm ⁻¹
<p>Die Energieübertragung (in keV) pro Wegstrecke (in µm) des ionisierenden Teilchens wird als "Linearer Energie Transfer" (LET) bezeichnet.</p>		

Tab 1: Physikalische Einheiten in der Strahlenbiologie (nach FRITZ-NIGGLI, 1997; HERRMANN und BAUMANN, 1997).

1.5.2 Relative Biologische Wirksamkeit (RBW)

Zum Erhalt der RBW vergleicht man die Wirkung einer Strahlung mit Gamma-Strahlen von Kobalt (^{60}Co) oder mit Röntgenstrahlen von 100-250 keV (FRITZ-NIGGLI, 1997).

$$\text{RBW} = \frac{\text{Energiedosis der Vergleichsstrahlung}}{\text{Energiedosis der zu untersuchenden Strahlung}}$$

Für die Berechnung wird jeweils der gleiche biologische Effekt zugrunde gelegt (Tod von 50% der Strahlenopfer oder die Anzahl gefundener DIZ).

Gleiche Dosen verschiedener Strahlenarten haben meist unterschiedliche biologische Wirkungen. Daher wird für jede Strahlenart zusätzlich ein Faktor definiert, der die unterschiedliche Wirksamkeit von verschiedenen Strahlenarten berücksichtigt. Dieser Faktor, genannt Qualitätsfaktor (q-Faktor), ist für Photonen- und Elektronenstrahlen eins und für andere Strahlenarten größer als eins. Für schwere Ionen kann $q=20$ sein. Dies bedeutet, dass schwere Ionen biologisch zwanzigfach effektiver sind als Photonenstrahlen.

Der Qualitätsfaktor betrachtet die stärkste Schädigungsmöglichkeit für das biologische Objekt als Bestrahlungseffekt und wird in Konventionen festgelegt (HERRMANN und BAUMANN, 1997). Der Wert, der sich aus der Multiplikation der Energiedosis und dem Faktor q ergibt, wird als "effektive Dosis" bezeichnet und in "Sievert" (Sv) angegeben. Ein Gray Röntgenstrahlen entspricht $1 \times 1 = 1 \text{ Sv}$ und ein Gray schwere Ionen $1 \times 20 = 20 \text{ Sv}$.

1.6 Ionisierende Strahlen

Unter Strahlung versteht man einen Energietransfer ohne ein vermittelndes Medium. Sind die energiereichen „Teilchen“, die sich von einer Strahlenquelle aus wellenförmig ausbreiten, im Ruhezustand ohne Masse, also reine Energie, dann handelt es sich um Photonen. Zu den Photonenstrahlen gehören beispielsweise Lichtstrahlen, UV-Strahlen, Röntgenstrahlen und Gamma-Strahlen. Strahlen aus Materie, so genannte Partikelstrahlen, sind Elektronen, Protonen, Neutronen, Atomkerne oder schwere Ionen. Energiereiche Strahlen können zu Ionisationen führen. Dabei werden Elektronen aufgenommen oder abgegeben und die beteiligten Atome oder Moleküle in geladene Teilchen umgewandelt. Allgemein werden Strahlen, je nach Wellenlänge, in ionisierende Strahlen (Wellenlänge <100 nm, etwa Röntgenstrahlen oder Ionenstrahlen) und nicht ionisierende Strahlen (Wellenlänge >100 nm, etwa UV-Strahlung) eingeteilt. Normalerweise befindet sich die Energie in den Atomkernen der Elemente im Gleichgewicht. Einige Elemente (etwa ab Ordnungszahl 84 = Polonium) sind jedoch einer ständigen energetischen Regulation unterworfen, bei der sie sich in Kerne anderer Atomarten umwandeln (Radioaktivität) und ionisierende Strahlen frei setzen. Die Art und Menge der Energie, die dabei freigesetzt wird, ist charakteristisch für diese Elemente.

Wenn ionisierende Strahlen ein Objekt durchqueren, dann beeinflussen sie die Elektronen der umliegenden Atome entlang des Strahlenganges. Allgemeine physikalische Effekte ionisierender Strahlen manifestieren sich als Erwärmung, als Anregung von Elektronen auf ein höheres Energieniveau sowie als Ionisationen. Die Effekte, die entlang des Strahlendurchgangs ausgelöst werden, sind für die jeweilige Strahlung charakteristisch. Die Energieübertragung (in keV) pro Wegstrecke (in μm) des ionisierenden Teilchens wird als "Linearer Energie Transfer" (LET) bezeichnet. Strahlenarten mit verschiedenen LET unterscheiden sich in der räumlichen Verteilung der Ionisationen. Beispiele nach FRITZ-NIGGLI (1997):

- a. Locker ionisierend für Röntgenstrahlen ($\text{LET} < 10 \text{ keV}/\mu\text{m}$, niedriger LET)
- b. Dicht ionisierend am Strahlengang schwerer Ionen ($\text{LET} \geq 10 \text{ keV}/\mu\text{m}$, hoher LET)

Demnach kann bei gleicher Strahlendosis aber anderer Strahlung der biologische Effekt verschieden sein.

1.6.1 Elektromagnetische Strahlen

1.6.1.1 Gamma-Strahlen

Beim Gamma-Zerfall wechselt der Atomkern von einem höherenergetischen zu einem niederenergetischen Niveau. Dabei werden elektromagnetische Strahlen ausgesendet. Die Gamma-Quanten bewegen sich mit einer Vakuumlichtgeschwindigkeit von 299793 km/sek, (FRITZ-NIGGLI, 1997) deren Reichweite theoretisch unendlich ist. Gamma-Strahlen begleiten fast alle Kernumwandlungen. Diese werden beispielsweise bei der klinischen Bestrahlung mit schweren Kohlenstoffionen zu Kontrollzwecken genutzt. Bei der Aussendung von Gamma-Strahlen ändert sich der Energiegehalt des Kerns, aber nicht seine Massen- und Ladungszahl.

1.6.1.2 Röntgenstrahlen

Die Röntgenstrahlen (auch X-Strahlen), benannt nach Wilhelm Conrad Röntgen (* 27.03.1845 in Remscheid-Lennep, † 10.02.1923 in München), gehören wie die Gamma-Strahlen zur Photonenstrahlung und unterscheiden sich nur in ihrer Entstehungsart.

Röntgenstrahlen entstehen, wenn Elektronen in metallischen Verbindungen abgebremst werden oder durch Elektronenübergänge in kernnahen Elektronenschalen. Demzufolge gibt es auch zwei Arten von Röntgenstrahlen (Bremsstrahlung und charakteristische Röntgenstrahlung). In einer Röntgenröhre werden aus der glühenden Kathode Elektronen ausgesendet, die von einer hohen Spannung zwischen Anode und Kathode beschleunigt werden. Treffen diese auf eine Wolframanode, wird die Energiedifferenz als Röntgenstrahlung ausgesendet. Die Bremsstrahlung wird umso wahrscheinlicher, je höher die Ordnungszahl der abbremsenden Materie ist.

Beim Herausschlagen von Elektronen aus den inneren Elektronenschalen entstehen „Freiräume“, die sofort von Valenzelektronen neu besetzt werden. Die damit verbundenen Energieübergänge sind in ihren Spektrallinien charakteristisch und können für diagnostische Zwecke eingesetzt werden.

1.6.2 Partikelstrahlen

1.6.2.1 Alpha-Strahlen

Es handelt sich dabei um beschleunigte Heliumatomkerne (2 Protonen/2 Neutronen), die aus dem Atomkern eines Radionuklids mit etwa 15000 km/s emittiert werden. Bei 5 MeV/n liegt deren Reichweite bei etwa 3,5 cm. Aufgrund von Wechselwirkungen mit den umgebenden Luftmolekülen werden Alpha-Strahlen abgebremst und zwei Elektronen aufgenommen. Dabei entsteht Helium.

1.6.2.2 Beta-Strahlen

Werden Elektronen aus dem Atomkern ausgesandt, handelt es sich um Beta-Strahlen. Sie bewegen sich in Zickzack-Bahnen. Die Reichweite liegt für 1 MeV bei etwa 4 m. Man unterscheidet zwei Varianten: Betaminus-Zerfall (Negatronen-Zerfall) und Betaplus-Zerfall (Positronen-Zerfall).

1.6.2.3 Neutronenstrahlen

Wenn eine spontane oder künstliche Kernspaltung auftritt, werden elektrisch neutrale Teilchen (Neutronen) aus dem Atomkern emittiert. In der Atmosphäre kann Neutronenstrahlung bei der Kollision kosmischer Teilchen mit Luftmolekülen ausgelöst werden. Neutronenstrahlung ist vorwiegend indirekt- und dicht ionisierend.

1.6.2.4 Schwerionen-Strahlen

Bei freien Atomen heben sich die Ladungen von Protonen im Kern und Elektronen in der Hülle gegenseitig auf, so dass das Atom nach außen elektrisch neutral ist. Werden Elektronen aus der Hülle entfernt, dominiert die positive Ladung des Kerns und es entstehen geladene Teilchen, so genannte Ionen. Entsprechend dem leichtesten Atom Wasserstoff und dem schwersten Atom, dem ^{238}U -Isotop, spricht man von leichten und schweren Ionen. Normalerweise werden alle Ionen, die schwerer als Helium (Ordnungszahl 2) sind, als schwere Ionen bezeichnet (FRITZ-NIGGLI, 1997). Bei den schweren Eisenionen, die in dieser Untersuchung verwendet wurden, sind technisch alle 26 Elektronen entfernt worden. Übrig blieb ein positiver Kern aus Protonen und Neutronen ($^{56}\text{Fe}^{26+}$). Schwere Ionen besitzen wegen ihrer Ladung und ihres LET hohe

und dicht ionisierende Eigenschaften. Entlang des Strahlengangs wird das Elektronengefüge der umgebenden Atome und Moleküle sehr stark gestört, weil das Ion durch Anlagerung von Umgebungselektronen ständig bestrebt ist, wieder elektrisch neutral zu werden. In biologischen Systemen können diese Ionisationsvorgänge zu vielfältigen und massiven Störungen führen, wie etwa zu CA. Diese biologische Wirksamkeit erhöht sich mit steigender Ordnungszahl. Für ionisierende Strahlen ist normalerweise die Anwesenheit von Sauerstoff ein wesentlicher Wirkungsfaktor. Sauerstoffreiche Zellen sind relativ strahlensensitiv, sauerstoffarme Zellen relativ strahlenresistent. Schwere Ionen wirken aber im Gegensatz zu Photonenstrahlen auch effektiv in sauerstoffarmen Zellen (FRITZ-NIGGLI, 1997; HERRMANN und BAUMANN, 1997). Deswegen werden sie mittlerweile auch für therapeutische Zwecke, wie etwa in der Krebstherapie, eingesetzt.

Ionen und Protonen werden aufgrund ihrer Masse kaum durch Stöße mit Elektronen in der Materie abgelenkt. Während bei Photonenstrahlen die Ionisation nach einer Eindringtiefe von 3 cm am höchsten ist und dann kontinuierlich abfällt, können schwere Ionen, abhängig von ihrer Energie, tief in Materie eindringen und ihr Ionisationsmaximum kurz vor ihrem Stillstand erreichen (Bragg-Peak). Davor und dahinter liegendes Gewebe wird daher kaum von der Strahlung belastet. Schwere Ionen können beim Auftreffen auf Materie, etwa bei menschlichem Gewebe, weitere sekundäre Partikel mit unterschiedlich hohem LET erzeugen. Interessant wird das für chromosomale Untersuchungen, deren Ziel die Berechnung von Strahlenexpositionen ist (Biodosimetrie), bei der Krebstherapie mit schweren Ionen und bei der Analyse sehr langer und weiter Weltraumflüge (GUDOWSKA, 2002).

1.6.3 Kosmische Strahlen

Die Erde steht permanent unter dem Einfluss hochenergetischer Teilchen, die aus dem Weltraum auf die Erde treffen. In der Zeit von 1911-1913 entdeckte der österreichische Physiker Viktor Franz Hess dieses Phänomen (Nobelpreis 1936), während er Messungen in etwa 5400 Meter Höhe aus einem Ballon heraus durchführte und feststellte, dass die ionisierende Strahlung mit der Höhe zunahm. Bislang war man davon ausgegangen, dass die ionisierenden Strahlen aus der Erdkruste stammten. Weil er auch Nachtflüge durchführte, konnte er belegen, dass nicht die Sonneneinstrahlung für die Ionisation verantwortlich war und deswegen die Strahlungsursache im Weltraum

zu suchen war (HESS, 1913). Heute weiß man, dass Hess' Arbeiten über die kosmische Strahlung die Grundlage für die gesamte spätere Strahlen- und Atomforschung bilden. Die kosmische Strahlung setzt sich aus etwa 98% Atomkernen (davon 87% Wasserstoffkerne, 12% Heliumkerne und 1% schwere Kerne) und 2% Elektronen zusammen. (HESS, 1913; GOSWAMI *et al.*, 1988). Obwohl der Anteil der schweren Ionen vergleichsweise gering ist, tragen sie dennoch entscheidend zur Dosiswirkung kosmischer Strahlen bei (NCRP, 2000). Es wird unterschieden zwischen „Solarer Kosmischer Strahlung“ und „Galaktischer Kosmischer Strahlung“. Die in kosmischen Strahlen enthaltenen Energien und Teilchen werden durch Wechselwirkung mit wandernden Magnetfeldern stufenweise beschleunigt und können Energien von bis zu 10^{20} eV ($1 \text{ eV} = 1,6 \times 10^{-19}$ Joule) erreichen (SIMPSON, 1983). Die Herkunft der „Galaktischen Kosmischen Strahlung“ liegt außerhalb unseres Sonnensystems. Ihr genauer Ursprung ist noch nicht vollständig geklärt.

Eine besonders hohe Strahlendosisleistung tritt auch in beiden Van-Allen-Gürteln auf (entdeckt 1958 von James van Allen, amerikanischer Physiker). Durch das Magnetfeld der Erde werden aus dem Sonnenwind oder der kosmischen Strahlung stammende Teilchen "eingefangen" und sammeln sich im Wesentlichen in zwei Strahlengürteln, welche sich zwischen den magnetischen Polen der Erde aufbauen. Der erste Gürtel befindet sich etwa zwischen 1000 und 5000 Kilometer Höhe über dem Äquator und enthält überwiegend Protonen, der zweite Gürtel befindet sich etwa zwischen 15000 und 25000 Kilometer über dem Äquator und enthält vorwiegend Elektronen. 1992 wurde ein weiterer Gürtel zwischen diesen beiden entdeckt.

Für die Raumfahrt können diese Bereiche aufgrund der hohen Strahlendosis zu Gefährdungen führen. Für bemannte Langzeit-Missionen oder sehr weite Flüge in den Weltraum ist es deswegen sehr wichtig, Strahlenrisiken abschätzen zu können, weil schon einzelne Partikel mit hohem LET in den meisten Organismen erhebliche zelluläre Schäden anrichten können (REITZ *et al.*, 1995).

1.7 Die Wirkung ionisierender Strahlen auf die Zelle

Die Strahlenempfindlichkeit von Zellen ist abhängig von ihrem DNA-Gehalt (SCHULTE-FROHLIN, 1990). Sie ist direkt proportional zu ihrer Teilungsbereitschaft und indirekt proportional zu ihrem morphologischen Differenzierungsgrad. Zellen mit einer hohen Zellteilungsrate und somit einer geringen Zellzyklusdauer zeigen somatische Reaktionen schon nach kurzer Strahlenbelastung. Im Gegensatz zu diesen „frühen somatischen Strahlenreaktionen“, etwa bei hämatologischem oder gastrointestinalem Gewebe, können die „späten somatischen Strahlenreaktionen“ bei Zellen mit niedriger Zellteilungsrate und langen Zyklusdauern nach etwa vier Wochen bis zwei Jahren auftreten. Strahleninduzierte Mutationen sind grundsätzlich ungerichtet, ihre Lokalisation innerhalb des Genoms folgt demnach ausschließlich statistischen Gesetzen. Eine Übersicht über Bestrahlungseffekte und deren zeitliche Abläufe ist in Tab. 2 dargestellt.

Vorgang	Zeitskala
Auslösender Vorgang: <u>Indirekt ionisierende Strahlen</u> (Röntgen-, Gamma-, Neutronen Strahlung)	$10^{-24} - 10^{-14}$ Sek.
<u>Direkt ionisierende Strahlen</u> (Elektronen, Protonen, α -Teilchen, Schwerionen)	$10^{-16} - 10^{-14}$ Sek.
Physikalisch-chemische Ebene Energieverlagerung als erster Schritt zur strukturellen Ionisation	$10^{-12} - 10^{-8}$ Sek.
Chemischer Schaden Freie Radikale, Molekulanregungen	10^{-7} Sek. - Stunden
Biomolekularer Schaden Proteine, Nukleinsäuren	ms - Stunden
Frühe makrobiologische Effekte Zelltod, Tod des Organismus	Stunden bis Wochen
Späte makrobiologische Effekte Krebsbildung, Genetische Veränderungen	Unter Umständen Jahre

Tab 2: Radiobiologische Schäden und ihr zeitliches Auftreten (Coggle, 1983).

Wegen der höheren Zellteilungsrate reagieren Embryonen aber auch Kinder und Jugendliche viel stärker auf Strahleneinwirkungen. Hinzu kommt der Zeitfaktor, der Kinder rein statistisch ein höheres Krebsrisiko zuschreibt, weil sie eine viel längere Lebensspanne vor sich haben. Ausdifferenziertes Nervengewebe ist wegen seiner fehlenden Zellteilungsaktivität relativ unempfindlich. Mit Ausnahmen ist das Gehirn relativ strahlenresistent. Nur sehr hohe Strahlendosen würden über direkte Strukturschädigungen auch Nervenzellen zerstören.

Bereits zu verschiedenen Zeiten wurden CA als Kennzeichen oder Ursache für radiobiologische Effekte herangezogen (Übersicht in CORNFORTH und BEDFORT, 1993). Sie sind besonders interessant in Verbindung mit biodosimetrischen Untersuchungen (LUCAS *et al.*, 1992; BAUCHINGER, 1995; DURANTE *et al.*, 1996) oder als Indikator für die Strahlenempfindlichkeit (JONES *et al.*, 1995). Werden biologische Objekte bestrahlt, so wird nur der absorbierte Energieanteil wirksam (Grotthus-Draper-Gesetz). Die Auswirkungen ionisierender Strahlen betreffen verschiedene biologische Ebenen (Tab. 3). Der entscheidende Angriffspunkt in der Zelle ist der Zellkern. Weil dort das Erbmateriale konzentriert ist, können Schäden der DNA zu CA führen. Ionisierende Strahlen, beispielsweise schwere Ionen, verzögern den Zellzyklus oder lösen eine andauernde DNA Synthese aus, woraus Zellen mit einem erhöhten DNA Gehalt resultieren (SCHOLZ *et al.*, 1989 und 1994). Verzögerungen im Zellzyklus können bei zytogenetischen Analysen dazu führen, dass die Schäden, die beispielsweise von kosmischer Strahlung hervorgerufen wurden, unterschätzt werden (DURANTE *et al.*, 1996).

Weil der Mensch überwiegend aus Wasser besteht, erfolgt die Strahlenabsorption hauptsächlich über Wassermoleküle. Die ionisierende Strahlung erzeugt Ionenprodukte des Wassers (Protonen und chemische Radikale), die wegen ihrer Elektronenkonfiguration besonders reaktiv sind. Diese Radikale sind in der Lage, mit Biomolekülen in ihrer Umgebung, etwa der DNA, zu reagieren. Energieabsorption und biologische Wirkung erfolgen also in verschiedenen Molekülen. Man spricht daher auch von einer indirekten Strahlenwirkung, wohingegen bei der direkten Strahlenwirkung die Energieabsorption unmittelbar im betroffenen Molekül, etwa in der DNA, erfolgt (HERRMANN und BAUMANN, 1997). Bei locker ionisierenden Strahlen erzeugen Radikale etwa 50% des schädigenden Gesamteffektes. Im Falle von dicht ionisierender Strahlung reagieren die Radikale vermehrt untereinander, so dass der Anteil indirekter Strahleneffekte rein statistisch zurückgeht.

Wird während einer Zellteilung das Zentriol in Folge von Strahlung geschädigt, führt dies meist dazu, dass in den Folgezellen Fehlverteilungen der Chromosomen auftreten. Wird die Kernmembran ebenfalls geschädigt, führt dies unter Umständen zu Stoffwechselstörungen zwischen Kern und Zytoplasma (Tab. 3). Im Zytoplasma selbst können Proteindenaturierungen die Viskosität verändern. Es kommt zur Bildung von Vakuolen („Röntgenbläschen“) im Plasma und zu Fettablagerungen in der Zelle. Ionisierende Strahlen können die Permeabilität der Zellmembran verändern. In den Membranen kommt es zu einer Potenzialänderung aufgrund von Fettablagerungen. Folglich treten Probleme bei den energieverbrauchenden Reparatursystemen in der Zelle auf. Zellorganellen mit defekten Membranen können meist die Energielieferungen nicht aufrecht halten, was zur Auflösung von Golgi-Apparaten und des rauen endoplasmatischen Retikulums führen kann.

Biologische Ebene	Auswirkung ionisierender Strahlen
Molekular	Schäden an Makromolekülen (RNA, DNA, Proteinen und Enzymen) sowie Beeinflussung von Stoffwechselwegen
Subzellulär	Schäden an Zellmembranen, Nukleus, Chromosomen, Mitochondrien und Lysosomen
Zellulär	Hemmung der Zellteilung, Zelltod
Gewebe, Organe	Induktion von Krebs, Störung des ZNS, Störung des Immunsystems, insbesondere an seinen Ursprüngen im Knochenmark.
Individuum	Tod, strahlungsbedingte Lebensverkürzung aufgrund von Folgekrankheiten
Population	genetische Veränderungen wegen Mutation von Individuen

Tab. 3: Auswirkung ionisierender Strahlung auf verschiedene biologische Ebenen (COGGLE, 1983).

Bei den Mitochondrien verhält es sich ähnlich wie bei der Zelle. Bei Verlust der *Christae Mitochondriales* kommt es zu Störungen in der Atmungskette. Auch hier treten Röntgenbläschen auf, die mit Fetteinlagerungen einhergehen und zum Zerfall des Mitochondriums führen können.

Für die Untersuchung strahleninduzierter DNA Schäden stellen DIZ und Fragmente wegen ihrer leichten Identifizierung wichtige zytogenetische Marker dar. Als Spontanaberrationswert wird etwa ein DIZ unter 1000 untersuchten Zellen angenommen. Im Verlauf der Zellteilung ist es möglich, dass wegen der DIZ „Anaphasebrücken“ gebildet werden, die zu unkontrollierten Strangbrüchen und schließlich zum Tod der Zelle führen (MCCLINTOCK, 1941). Bei ionisierenden Strahlen steigen die Zahl der DIZ linear quadratisch und die der Brüche linear zur Dosis an (Abb. 2). Strahlen mit niedrigem LET zeigen bei steigender Dosis einen linearen Anstieg der DIZ, während bei Strahlen mit hohem LET der Verlauf eher linear quadratisch ist. Dicht ionisierende Strahlen wie Alpha-Strahlen, Neutronen oder schwere Ionen induzieren sehr viele DSB entlang ihrer Teilchenspur. Die Konzentration der DSB in einem kleinen Bereich des Zellkerns begünstigt besonders die Entstehung von komplexen intra- und interchromosomalen Aberrationen (GRIFFIN *et al.*, 1995).

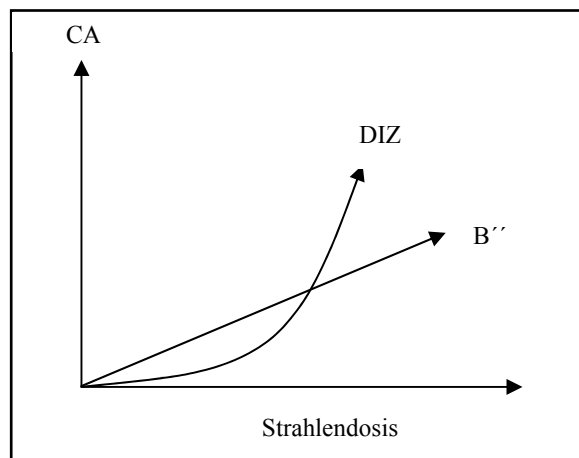


Abb. 2: Abhängigkeit von CA und Strahlendosis bei der Entstehung von DIZ und B''.

Die Dichte der DSB bei locker ionisierenden Strahlen, wie bei Röntgenstrahlung, ist weitaus geringer, so dass zwei unabhängige Bruchereignisse erfolgen müssen, um einen DSB zu erzeugen.

Bei dicht ionisierender Strahlung kann ein Teilchen bereits ausreichen, um mehrere DSB auszulösen. Die Verteilung der CA ist mitunter beeinflusst durch benachbarte Bruchereignisse. Demnach fusionieren besonders die freien DNA-Enden „falsch“ miteinander, deren Bruchereignisse nah beieinander auftreten, im Gegensatz zu denen, die entfernt voneinander sind (SAX, 1938). In diesem Zusammenhang wurde bereits vor der Verwendung von FISH-Techniken darauf hingewiesen, dass die Verteilung verschiedener Aberrationen zusätzlich darauf beruhen können, dass die Chromosomen

in der G0/G1-Phase innerhalb des Zellkerns territorial lokalisiert sind statt gleichmäßig verteilt (SAX, 1938; SAVAGE und PAPWORTH, 1973). Bisherige Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Induktion der DSB zufällig erfolgt (SACHS *et al.*, 2000). Neueste Ergebnisse zeigen aber eine Abhängigkeit von strahleninduzierten Aberrationen gemäß der Lokalisation der DNA im Zellkern (NIKIFOROVA *et al.*, 2000). GOODHEAD (1989) schlägt für die Induktion von DSB ergänzend vor, folgende vier Situationen für ionisierende Strahlen in die Analyse einzubeziehen:

1. Ionisationen, die so schwach sind, dass sie nur geringe biologische Relevanz haben.
2. Ionisationen, die zwar seltene aber äußerst komplexe Ereignisse an der DNA verursachen.
3. Ionisationen, die lokal gehäuft am Ende der Flugbahn eines Elektrons auftreten oder die DNA oder deren assoziierte Moleküle direkt schädigen.
4. Ionisationen, die in ihrer Schädigung Punkt 1 deutlich übersteigen und auch wesentlich komplexere Schäden an und innerhalb der DNA verursachen.

Punkt 1 und 3 sind dabei typische Erscheinungsbilder für locker ionisierende Strahlen, wie etwa Röntgenstrahlen. Punkt 2 und 4 sind typisch für dicht ionisierende Strahlen, wie etwa für schwere Ionen oder Alpha-Strahlen.

1.8 Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL)

Aufgaben des Blutes sind der Stofftransport, die Temperaturregulation, die Signalübermittlung mittels Hormonen, Pufferung sowie die Abwehr körperfremder Stoffe. Für Chromosomenuntersuchungen werden die Lymphozyten des peripheren Blutes (engl.: *peripheral blood lymphocytes*, PBL) als Bestandteil des Immunsystems bevorzugt, weil sie sich meist in der G0-Phase des Zellzyklus befinden und deswegen nicht teilungsaktiv sind. Schäden an der DNA in PBL bleiben aus diesen Gründen lange erhalten. Für Analysezwecke kann man PBL in einer Blutkultur mit Phytomämagglutinin (PHA), einem Lektin aus der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris*, zur Teilung anregen (NOWELL, 1960). Weil man diesen Zeitpunkt mit dem Ansatz der Kultur bestimmen kann, lassen sich die aktuellen Phasen des Zellzyklus ungefähr bestimmen. Nur die „kleinen Lymphozyten“ sind für die Stimulation mit PHA

empfindlich (CARSTAIRS, 1962). Diese Zellen enthalten relativ wenig Zytoplasma und haben einen Durchmesser von etwa $6\mu\text{m}$ und ein Volumen von etwa $110\mu\text{m}^3$.

Ab etwa 100-200 mSv (IAEA, 2001) können Strahlenwirkungen mit dosimetrischen Methoden erfasst werden, bei mehreren hundert mSv sind bereits Blutbildveränderungen feststellbar. Für die Biodosimetrie nach Strahlenunfällen sollte jederzeit bedacht werden, dass es bei Bestrahlung eines großen Teils des Körpers mit Dosen von etwa 1 Sv zu einer plötzlichen Abnahme der PBL im Blut kommt (Lymphozytensturz).

1.9 Analysetechniken

1.9.1 Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung (Azur-Eosin-Methylenblaulösung), benannt nach Gustav Giemsa (deutscher Chemiker und Bakteriologe, 1867-1948), eignet sich für die Untersuchungen allgemeiner struktureller CA, wie Fragmente, Ringe und DIZ. Sie ist im Vergleich zu FISH preiswert und benötigt für die Analyse einen geringen materiellen Aufwand. Giemsa-Farbe färbt die Chromosomen alle gleich an. Die Präparate können mit einem normalen Lichtmikroskop analysiert werden.

1.9.2 Fluoreszenz-Färbung

Fluoreszierende Stoffe (Fluorochrome) können mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Elektronen werden dabei auf ein höheres Energieniveau gehoben. Unter Aussendung von Licht (Emission) einer spezifischen Wellenlänge gelangen die Elektronen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Die ausgesendete Wellenlänge ist dabei länger als die Anregungswellenlänge. Diese Eigenschaft kann für die Mikroskopie genutzt werden, indem beispielsweise DNA mit Fluorochromen markiert wird. Zwei der am häufigsten verwendeten Fluorochrome sind Fluorescein, welches grünes Licht emittiert, wenn es von blauem Licht angeregt wird, und Rhodamin, welches rot fluoresziert, wenn es mit grün-gelbem Licht angeregt wird.

Die Lichtquelle für Anregungswellenlänge des ausgewählten Fluorochroms ist meist eine Quecksilberhochdrucklampe. Aus dem gesamten Beleuchtungsspektrum wird mit Hilfe eines Eingangsfilters (Anregungsfilters) die anregende Wellenlänge des

Fluorochroms herausgefiltert. Diese Anregungsstrahlung gelangt auf einen dichromatischen Teilerspiegel, der das kurzwellige Erregerlicht reflektiert und das langwellige Licht der Emissionsstrahlung durchlässt. Die Anregungsstrahlung gelangt durch das Objektiv auf das Präparat und regt dort das Fluorochrom an langwelliges Licht zu emittieren. Dieses Licht passiert wiederum den dichromatischen Teilerspiegel und trifft auf den Ausgangssperrfilter (Emissionsfilter). Dieser filtert die gewünschte Emissionswellenlänge des Fluorochroms heraus und bildet auf diese Weise das eigentliche Fluoreszenzbild ab (Abb. 3).

Weil bei mFISH und mBAND insgesamt sechs verschiedene Fluorochrome zum Einsatz kommen, sind entsprechend auch sechs Filter notwendig, die manuell oder automatisch gewechselt werden müssen.

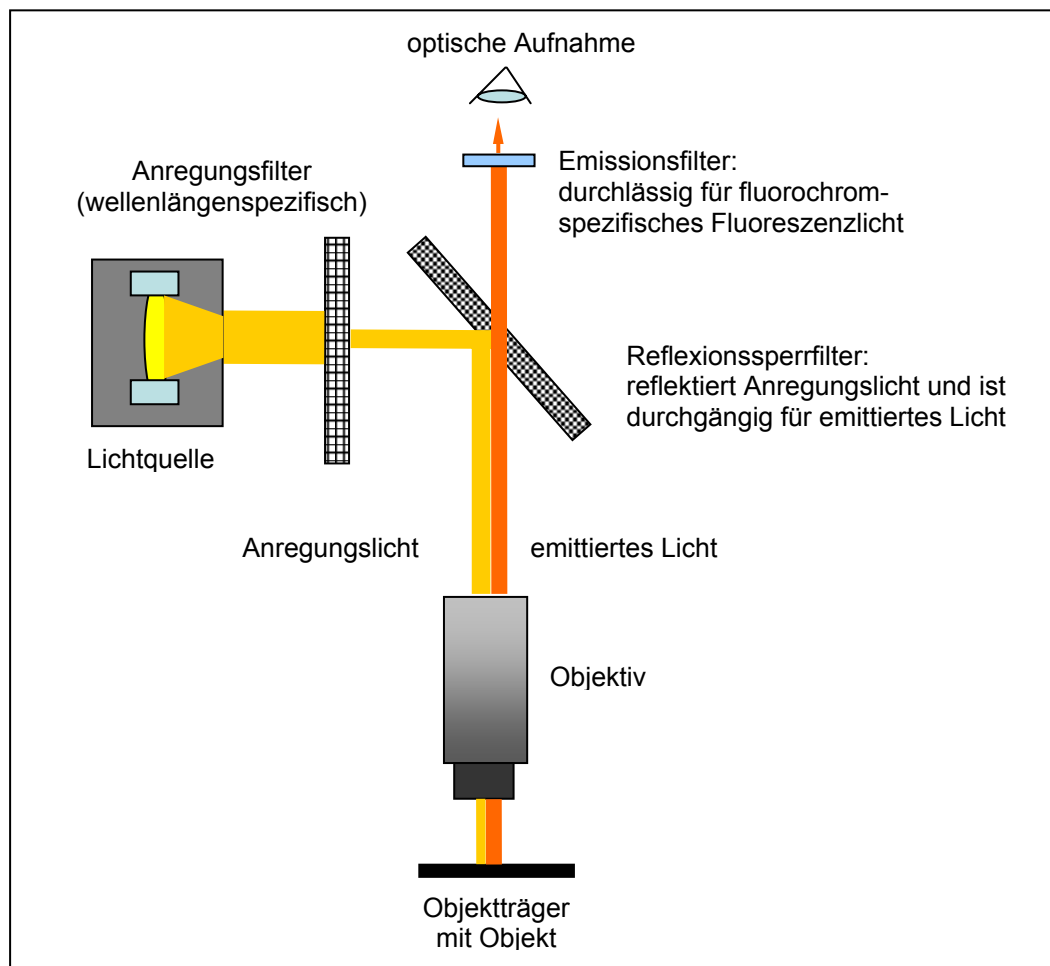


Abb. 3: Lichtweg in einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop.

1.9.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

In den ersten *in situ* Hybridisierungen verwendete man zur Markierung der DNA radioaktiv markierte DNA- und RNA-Sonden (PARDUE und GALL, 1969). Das FISH-Verfahren (engl.: *fluorescence in situ hybridisation*, FISH) wurde erst Anfang der 1980er Jahren entwickelt (LANGER *et al.*, 1981). FISH kennzeichnet eine Technik, die mit Fluorochromen ganze Chromosomen oder Teile von diesen differenziell markiert und sichtbar macht (Abb. 4). Deswegen wird oft auch vereinfacht von „FISH-Färbung“ oder „gefärbten Chromosomen“ gesprochen.

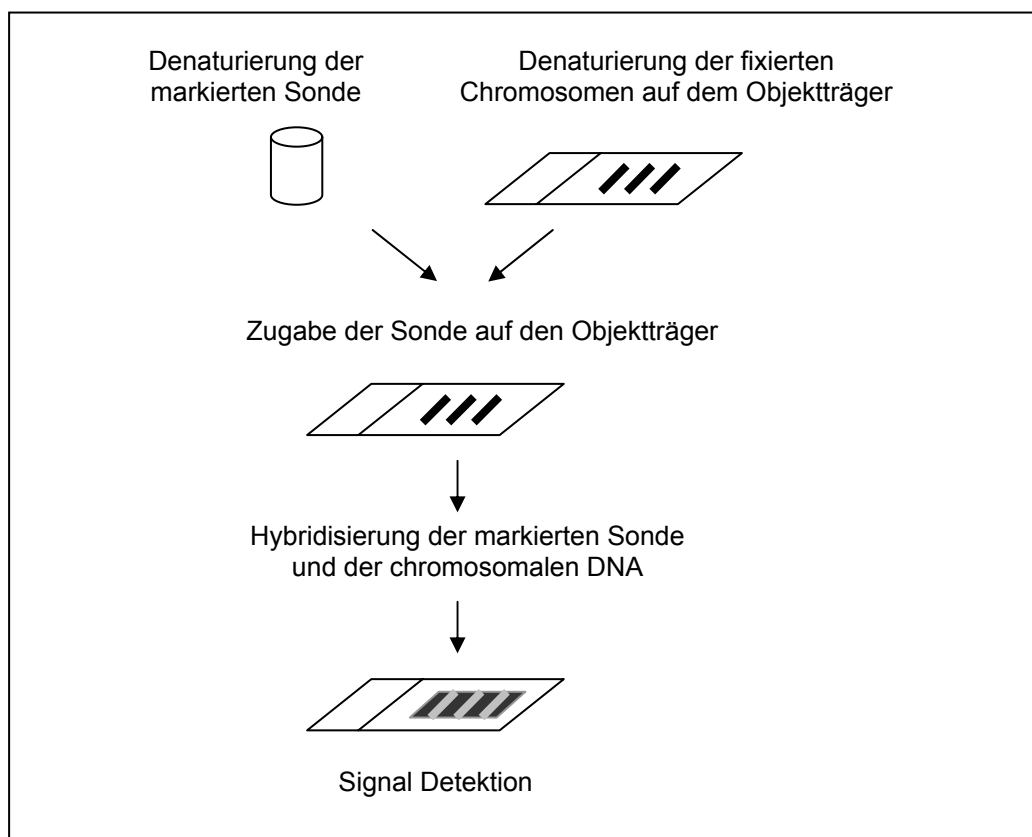


Abb. 4: Schema einer *in situ* Hybridisierung.

Dazu wird die zu untersuchende DNA mit einem DNA-Einzelstrang (= Sonde) hybridisiert, der mit einem Fluorochrom markiert ist (direktes Markierungsverfahren). In Kombination kann auch Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (Biotin-dUTP) an die DNA-Sonden gebunden sein. Diese wird dann über Streptavidin, das hier wie ein Antikörper gegen Biotin funktioniert, nachgewiesen. Streptavidin selbst ist mit dem eigentlichen Fluorochrom markiert.

Dieses zweite indirekte Markierungsverfahren lässt sich beliebig in der Signalstärke erhöhen, indem biotinyliertes Anti-Streptavidin und wiederum Streptavidin plus Fluorochrom angelagert wird. Allerdings führt eine zu starke Markierung nach dem zweiten Verfahren auch zu Problemen bei der Analyse, weil die direkt markierten Signale überstrahlt werden können. Für das direkte und das indirekte Verfahren (Abb. 5) gilt, dass in anschließenden Arbeitsschritten die nicht hybridisierte DNA oder RNA entfernt wird, um störende Zusatzsignale zu vermeiden.

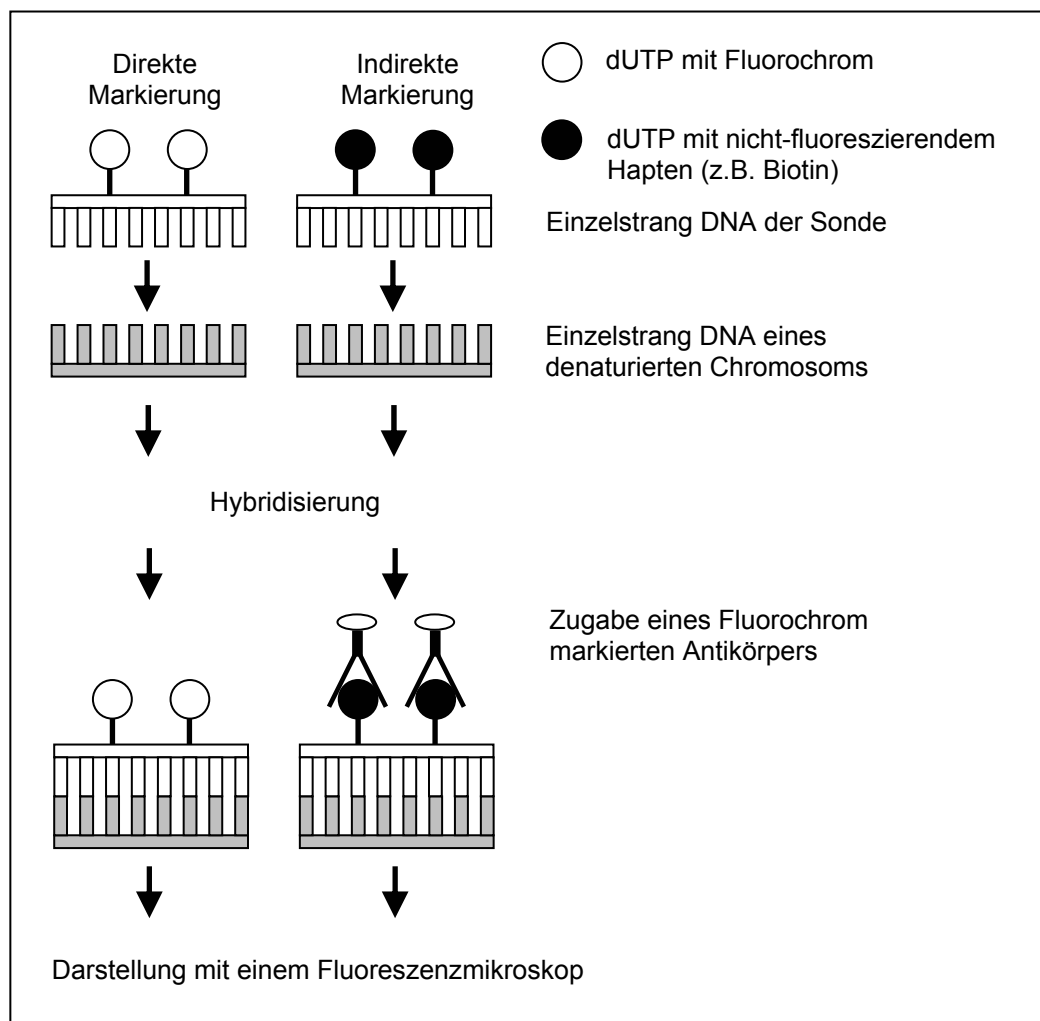


Abb. 5: Direkte und indirekte fluorochromale Markierung.

Chromosomen, die mit dieser Technik hybridisiert wurden, lassen sich in einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop analysieren. Die Auswertung erfolgt je nach Komplexität und Anzahl der verwendeten Fluorochrome direkt im Mikroskop oder mit Hilfe eines computerunterstützten CCD-Kamera-Aufnahmesystems.

1.9.3.1 24-Farben-FISH (mFISH)

Die Technik der „*multicolor fluorescence in situ hybridization*“ (mFISH) (SPEICHER *et al.*, 1996), ist die geeignete Methode, Interchange zwischen allen Chromosomen eines Chromosomensatzes schnell zu erkennen. Zusätzlich sind alle CA sichtbar, die auch bei einer Giemsa-Färbung erkennbar wären. Die Einsatzmöglichkeiten reichen von der „Färbung“ einzelner Chromosomen bis hin zur „Färbung“ aller Chromosomenpaare. Für strahlenbiologische Studien zur Strahlendosis und Strahlenqualität eignet sich diese Methode besonders gut, weil beispielsweise reziproke Translokationen über einen längeren Zeitraum (nach Bestrahlung) nachweisbar bleiben und retrospektiv genutzt werden können (NATARAJAN und OBE, 1999). Damit die 24 Chromosomen (22 Autosomen plus X und Y Chromosom) farbig zu unterscheiden sind, werden fünf Fluorochrome plus DAPI (siehe Abb. 7 in Kapitel „Material und Methoden“) eingesetzt. Sechs Einzelbilder, die per Computer-Software überlagert werden, ergeben dann ein Gesamtbild, in welchem die 24 Chromosomen in 24 Falschfarben dargestellt werden können. Aufgrund der Vielzahl gefärbter Chromosomen, die letztlich per Software berechnet werden, ist eine gewisse Vorsicht bei der Auswertung angebracht. Vergleichende Untersuchungen mit mBAND haben gezeigt, dass kleine Fragmente in mFISH unter Umständen übersehen werden. Dies mag auch an Kalibrierungstoleranzen der Untersuchungssoftware liegen, die entweder in die eine oder andere Richtung Korrekturen zulässt.

Eine ähnliche Technik zur Markierung und „Färbung“ aller Chromosomen ist SKY (Spektral Karyotyping/Spektrale Karyotypisierung), die zeitgleich zu mFISH von SCHRÖCK *et al.* (1996) entwickelt wurde.

1.9.3.2 Viel-Farben-Bänderung (mBAND)

Für die Analyse von Veränderungen innerhalb eines Chromosoms (Intrachangen) oder zwischen homologen Chromosomen bietet sich eine Form von Bänderungstechnik für das zu untersuchende Chromosom an. Die ersten Methoden, dies mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung verwirklichten, waren „*chromosome bar codes*“ (CBC, LENGAUER *et al.*, 1993; MÜLLER *et al.* 1997) und „*cross species chromosome painting*“ (FERGUSON-SMITH, 1997, MÜLLER *et al.*, 1998). Deren Genauigkeit erreicht jedoch nicht die Auflösung des nachstehend beschriebenen Verfahrens. Methoden mit ähnlichem Auflösungsvermögen sind „*multicolor chromosome banding*“ (MCB, LIEHR *et al.*,

2002), *Rx-FISH* (MÜLLER und WIENBERG, 2001) und „*spectral color banding*“ (SCAN, KAKAZU *et al.*, 2003). Die Methode des „*high resolution multicolor banding FISH*“ (mBAND) wurde für das Chromosom 5 erstmalig 1999 von der Firma Metasystems vorgestellt (CHUDOKA *et al.*, 1999). Inzwischen sind aber für alle menschlichen Chromosomen, außer dem Y-Chromosom, mBAND-Sonden verfügbar (METASYSTEMS, 2003)

Sieben teilweise überlappende DNA-Bibliotheken sind für Chromosom 5 erstellt worden (zwei für den p-Arm und fünf für den q-Arm). Die Markierung wird mit fünf verschiedenen Fluorochromen durchgeführt. Vier davon werden direkt an Nukleotide gebunden. Die fünfte Sonde ist mit Biotin markiert, das mit Streptavidin-CyTM5 detektiert wird. Die Überlappung der Fluoreszenz-Sonden bewirkt eine unterschiedliche Leuchtintensität am Chromosom. Diese Unterschiede können per Computer in Falschfarben umgerechnet werden und erzeugen auf diese Weise die charakteristische Bänderung von mBAND gefärbten Chromosomen. Obwohl DNA-Sonden für fast alle Chromosomen verfügbar sind, ist allerdings von deren gleichzeitigen Einsatz für verschiedene Chromosomen aus Gründen der Übersicht und der Zuordnung der Banden abzuraten. Fragmente verschiedener Chromosomen wären hinsichtlich der Banden nicht mehr sicher zuzuordnen.

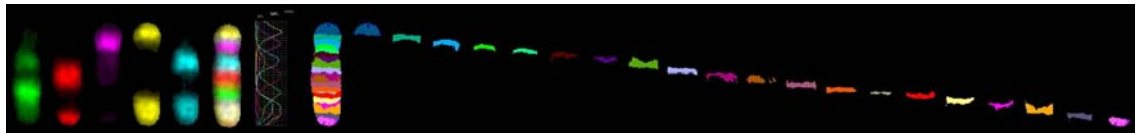


Abb. 6: Bandendarstellung in mBAND (Mit freundlicher Genehmigung von METASYSTEMS®).

Mit mBAND können perizentrische Inversionen (NATARAJAN *et al.*, 1996), parazentrische Inversionen oder Intrachange und komplexe Interchange erkannt werden. Bei Johannes *et al.* (1999) werden Analysen von strahleninduzierten chromosomalen Veränderungen mit mBAND an Chromosom 5 beschrieben.

Weil aber nur ein Chromosom mit mBAND markiert ist, kann man in stark fragmentierten Chromosomen unmöglich feststellen, welches weitere mit DAPI markierte Chromosom (fortan als DAPI-Chromosom bezeichnet) an einer Aberration beteiligt ist. Insertionen des gebänderten Chromosoms sind daher kritisch zu betrachten. Ein insertiertes gebändertes Fragment muss nicht zwangsläufig eine klassische Insertion in ein anderes Chromosom darstellen. Formal denkbar wäre auch eine komplexe Translokation zwischen drei verschiedenen Chromosomen, die wie eine Insertion in ein

Chromosom aussieht. Ähnlich verhält es sich bei reziproken Translokationen. Nur wenn das nicht gebänderte Fragment eindeutig zuzuordnen ist, kann man sich bei dieser Aberration sicher sein. Eine selbst durchgeführte Kontrolle mit mFISH hat die Existenz solcher Insertionen bestätigt, die tatsächlich komplexe Translokationen zwischen drei Chromosomen oder mehr sind. Sofern man eine Aussage über die Anzahl von Insertionen und reziproken Translokationen treffen möchte, sollte man bedenken, dass einige dieser Aberrationen komplexere Translokationen sein könnten. Mit mBAND ist es möglich, Bruchpunkte als SORBs (engl.: *selected observed residual breakpoints*) zu lokalisieren (SAVAGE, 1991; OBE *et al.*, 2002). Die SORBs können den Falschfarbbanden zugeordnet werden. Auf diese Weise lassen sich Bruchhäufungen (engl.: *Hot Spots*), im Chromosom lokalisieren. Für eine exakte Zuordnung der Bruchpunkte und deren Übertragung auf entsprechende G-Banden ist es allerdings notwendig, die Emissionsspektren in mBAND zu analysieren (JOHANNES *et al.*, 1999).

1.9.3.3 Pan-Zentromer-Färbung

Die Pan-Zentromer-Färbung ist eine FISH-Färbung, bei der die Zentromere aller menschlichen Chromosomen mit Fluorochromen markiert werden und im Fluoreszenzmikroskop rot leuchten. Die Chromosomen werden mit DAPI gegengefärbt und leuchten blau. Diese Technik eignet sich besonders für die Auswertung von CA, bei denen mindestens zwei Zentromere vorhanden sind (etwa DIZ) oder bei Chromosomenpräparaten, deren Zentromere bei Verwendung anderer Färbetechniken schwer zu erkennen sind.

1.10 Analyse und Auswertung in mBAND

Die Analyse von mBAND gefärbten Präparaten ist oft schwierig, weil mit dieser Methode Aberrationen sehr differenziert analysiert werden können. Herkömmliche Bezeichnungen, wie Insertionen und reziproke Translokationen, können die Aberrationen nicht immer ausreichend beschreiben. Bei einer Zelle, deren Chromosomen stark fragmentiert sind, lässt sich anhand eines Chromosoms nicht mit Sicherheit sagen, ob eine Translokation reziprok ist oder nicht. Einlagerungen des gebänderten Chromosoms zwischen zwei DAPI gefärbten Fragmenten (fortan als

DAPI-Fragmente bezeichnet) müssen nicht unbedingt eine „klassische“ Insertion sein. Eine Translokation zwischen drei Chromosomen oder mehr wäre auch denkbar.

Zur genauen Beschreibung der Aberrationen ist es unumgänglich einen Analysecode zu benutzen, mit dem eine weitgehend vollständige Rekonstruktion der ursprünglichen Aberration möglich ist. Bisherige Nomenklaturen, wie „*PAINT*“ (TUCKER *et al.*, 1995; SAVAGE und TUCKER, 1996), „*mPAINT*“ (CORNFORTH, 2001), „*S&S*“ oder „*CAB*“ (SAVAGE and SIMPSON, 1994a, b) sind nicht ausreichend, weil sie die für mBAND charakteristische Bänderungstechnik nicht berücksichtigen. Eine für diese Untersuchung entwickelte Nomenklatur (siehe Kapitel „Ergebnisse“), die mit mBAND anwendbar ist, greift auf Aspekte der verschiedenen Systeme zurück, damit eine Vergleichbarkeit der gesammelten Daten gewährleistet bleibt.

1.11 Gegenüberstellung von Giemsa-, mFISH- und mBAND-Technik

Die Angaben „ja“ und „nein“ sind nicht absolut zu sehen, sondern stellen den Normalfall dar. In Ausnahmefällen ist eine Auswertung bei „nein“ dennoch möglich.

	<u>uniforme</u> <u>Giemsa-Färbung</u> Auswertung möglich?	mFISH Auswertung möglich?	mBAND Auswertung möglich?
a) perizentrische Inversionen	ja (eingeschränkt)	ja (eingeschränkt)	ja
b) parazentrische Inversionen	nein	nein	ja
Insertionen	nein	ja	ja
interstitielle Deletionen	nein (nicht von terminalen Deletionen zu unterscheiden!)	nein (nicht von terminalen Deletionen zu unterscheiden!)	ja
terminale Deletionen	nein (nicht von interstitiellen Deletionen zu unterscheiden!)	nein (nicht von interstitiellen Deletionen zu unterscheiden!)	ja
Translokationen (reziprok)	nein	ja	ja (eingeschränkt)
Translokationen (in homologen Chromosomen)	nein	nein	ja
Translokationskomplexe	nein	ja	ja
intrachromosomale Translokationen	nein	nein	ja
interchromosomale Translokationen	ja (eingeschränkt)	ja	ja
Fragmente	ja (bei vielen Fragmenten ist die Zuordnung schwierig oder unmöglich)	ja	ja
Ringe	ja	ja	ja
DIZ	ja	ja	ja

Tab. 4: Methodenvergleich Giemsa, mBAND und mFISH für CA.

1.12 Ziele dieser Arbeit

Astronauten sind während ihrer Weltraumflüge verschiedenen ionisierenden Strahlen, wie Röntgenstrahlung, Schwerionenstrahlung oder kosmischer Strahlung, ausgesetzt. Die Dosis entspricht etwa 0,5-1 mSv pro Tag (DURANTE, persönliche Mitteilung). Entsprechende dosimetrische Grenzwerte für Astronauten werden bei SINCLAIR (1984, 2000) beschrieben. Terrestrische Untersuchungen haben gezeigt, dass ionisierende Strahlen CA induzieren und somit mutagen sind (OBE *et al.*, 1992). Forschungen an Astronauten von D2- und MIR-Missionen ergaben, dass unter Weltraumbedingungen CA induziert werden, deren Häufigkeit mit dem Ausmaß der Strahlenexposition korreliert ist (OBE *et al.*, 1997, YANG *et al.*, 1997; GRECO *et al.*, 2002).

Schwere Fe-Ionen können auf der Erde nur aufwendig erzeugt werden. Sie kommen aber im Weltraum natürlicherweise vor. Ihr Einfluss auf die Chromosomen ist auf der Erde und im Weltraum immer noch nicht geklärt (SCHIMMERLING *et al.*, 1998). Der Wirkungsanteil der Fe-Ionen an der gesamten Strahlenexposition im Weltraum ist allerdings erheblich (NCRP, 2000). Wenn schwere Ionen auf Materie auftreffen, kann materialabhängig Sekundärstrahlung erzeugt werden, deren Qualitätsfaktor höher sein kann als die ursprüngliche Strahlung. Für die Abschätzung des genetischen Risikos in der bemannten Raumfahrt ist es wichtig zu wissen, welche CA in welchen Verteilungen von schweren Ionen verursacht werden können.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse von CA in menschlichen PBL, die nach Einwirkung ionisierender Strahlen, speziell von schweren Fe-Ionen mit einer Energie von 200 MeV/n und 500 MeV/n, entstehen. Für die Analyse wurden PBL verwendet, die *in vitro* mit schweren $^{56}\text{Fe}^{26+}$ -Ionen im „National Institute for Radiological Sciences“ (NIRS) in Chiba (Japan) bestrahlt wurden, sowie Blut von Astronauten der internationalen Raumstation ISS.

Analysiert wurden bei der *in vitro* Bestrahlung vorzeitig kondensierte Chromosomen und bei den Astronauten Metaphasechromosomen. Intrachromosomale CA (etwa Inversionen, interstitielle Fragmente und intrachromosomale Translokationen) sowie komplexe interchromosomale CA sind Schwerpunkte der Analyse. Für die Untersuchungen wurden neben der klassischen Giemsa-Färbung die modernen Verfahren mFISH, mBAND und die Pan-Zentromer-Färbung eingesetzt. Diese

Techniken ermöglichen es komplexe CA sichtbar zu machen. Die mFISH-Technik erlaubt reziproke Translokationen oder komplexe Aberrationen aus mehreren Chromosomen zu erkennen. Mit mBAND können aufgrund der speziellen Bänderungstechnik komplexe Aberrationen auch innerhalb eines Chromosoms dargestellt werden. Ein Vergleich der mit diesen Methoden erstmalig erhobenen Daten soll neue Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Aberrationen aufdecken und zu einem besseren Verständnis der Induktion von Chromosomenaberrationen beitragen. Vergleichend werden für die vorliegende Untersuchung Ergebnisse von JOHANNES *et al.* (2003) aus *in vitro* Bestrahlungen mit Röntgenstrahlen und Neutronenstrahlen sowie eine Behandlung mit der Restriktionsendonuklease AluI herangezogen.

Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften besitzen schwere Ionen eine sehr hohe relative biologische Wirksamkeit, so dass man mit massiven Schäden rechnen muss. Es wäre interessant zu erfahren, ob CA induziert werden können, die typisch für schwere Ionen sind, damit eine „Signatur“ oder ein „Fingerabdruck“ für die Wirkung dieser dicht ionisierenden Strahlen erstellt werden kann, wie ANDERSON *et al.* (2000, 2003) es beispielsweise für Alpha-Partikel vorschlagen. Die Ergebnisse können bei der Entwicklung von Schutzmaßnahmen für Langzeitaufenthalte im Weltraum hilfreich sein. Besonders im Hinblick auf bemannte Flüge zum Mars müssen entsprechende Schutzmaßnahmen gegen die ionisierende Strahlung getroffen werden (OBE *et al.*, 1999; SIMONSEN *et al.*, 2000).

2. Material und Methoden

2.1 Mit Fe-Ionen *in vitro* bestrahlte PBL

Die Präparate wurden aus PBL hergestellt, die freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Marco Durante (Dipartimento di Scienze Fisiche, Università "Federico II" Monte S. Angelo, Via Cintia, 80126 Napoli, Italien) zur Verfügung gestellt wurden. Nach seinen Angaben stammte das Blut von einer gesunden 40 Jahre alten weiblichen Spenderin. Ihre PBL wurden in einem Vacutainer CPT isoliert, in RPMI 1640 Medium mit 20% Serum (ohne PHA) resuspendiert und mit einer Spritze in eine 1 ml Plexigasküvette umgefüllt. Die Bestrahlungskammer sowie die Küvette hatten eine Wandstärke von 1 mm.

Die PBL wurden anschließend *in vitro* mit schweren Eisenionen bei Raumtemperatur im Schwerionen-Beschleuniger HIMAC am *National Institute for Radiological Science* (NIRS, Chiba, Japan) bestrahlt ($^{56}\text{Fe}^{26+}$ -Ionen mit einer Energie im Vakuum von 200 MeV/n und 500 MeV/n; Dosen: 0,5 Gy, 0,75 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 4 Gy). Der Maximalwert der Energie lag am Ort der Bestrahlung für Ionen mit 200 MeV/n bei effektiv 115 MeV/n (mittlerer LET 442 keV/ μm) für Ionen mit 500 MeV/n bei effektiv 414 MeV/n (mittlerer LET 200 keV/ μm). Die Energieabnahme erklärt sich durch die verschiedenen Eindringtiefen in Wasser von 8 mm für Ionen mit 200 MeV/n und 71.6 mm für Ionen mit 500 MeV/n. Die Energiedosisleistung war 1 Gy/min. Wird für den Zellkern menschlicher PBL ein Durchmesser von etwa 6 μm vorausgesetzt, dann ist anzunehmen, dass bei einer Dosis von 1 Gy statistisch ein Ion den Zellkern durchquert (JOHANNES *et al.*, 2003). Umgehend nach der Bestrahlung wurden die Zellen bei 37°C in Kultur gegeben und die Chromosomen mit Calyculin A vorzeitig kondensiert.

Die bestrahlten PBL wurden mit folgenden zytogenetischen Methoden analysiert:

Methode	mBAND	mFISH	Pan-Zentromer-
Dosis/Strahlentyp	[Zellzahl]	[Zellzahl]	Färbung [Zellzahl]
Kontrolle	252	-	-
0,5 Gy Fe-Ionen 200 Me V/n	151	-	-
1 Gy Fe-Ionen 200 MeV/n	144	-	152
0,5 Gy Fe-Ionen 500 MeV/n	244	-	-
0,75 Gy Fe-Ionen 500 MeV/n	262	-	-
1 Gy Fe-Ionen 500 MeV/n	432	183	234
2 Gy Fe-Ionen 500 MeV/n	70	-	-
3 Gy Fe-Ionen 500 MeV/n	108	-	-
4 Gy Fe-Ionen 500 MeV/n	248	128	202

Tab. 5: Anzahl untersuchter Zellen pro Dosis und Untersuchungsmethode.

2.2 Mit kosmischer Strahlung *in vivo* bestrahlte PBL

Die PBL von Astronauten wurden mit folgenden zytogenetischen Methoden analysiert:

Taxiflug	mBAND	mFISH	Giemsa
Astronauten	[Zellzahl]	[Zellzahl]	[Zellzahl]
Astronaut 1 – vor dem Flug	-	251	1677
Astronaut 1 – nach dem Flug	-	155	1687
Astronaut 2 – vor dem Flug	-	105	2438
Astronaut 2 – nach dem Flug	-	113	1068
Astronaut 3 – vor dem Flug	129	103	2316
Astronaut 3 – nach dem Flug	120	192	1052

Tab. 6: Anzahl untersuchter PBL und Methoden, für einen Taxiflug zur Raumstation ISS mit einer Aufenthaltsdauer von neun Tagen.

Der kurze Weltraumaufenthalt („Taxiflug“) dient als Kontrolle (Tab. 6). Stellvertretend für alle Astronauten dieses Fluges wurden nur PBL von Astronaut 3 mit mBAND untersucht.

Langzeitbesatzung	mBAND	mFISH	Giemsa
Astronauten	[Zellzahl]	[Zellzahl]	[Zellzahl]
Astronaut 4 – vor dem Flug	106	90	1020
Astronaut 4 – nach dem Flug	102	155	659
Astronaut 5 – vor dem Flug	103	231	851
Astronaut 5 – nach dem Flug	150	180	811
Astronaut 6 – vor dem Flug	102	273	902
Astronaut 6 – nach dem Flug	102	155	325

Tab. 7: Anzahl untersuchter PBL und Methoden, für Astronauten eines Langzeitfluges zur Raumstation ISS mit einer Aufenthaltsdauer von fünf Monaten.

Alle Astronauten in der Raumstation ISS (Taxiflug und Langzeitbesatzung) befanden sich auf einer mittleren Höhe von 360-450 Km unterhalb des Van Allen-Gürtels. Die Strahlendosis vor Ort war etwa 0,5-1 mSv pro Tag (DURANTE, persönliche Mitteilung).

2.3 Sterile Arbeitsbedingungen

Voraussetzung für die Kultivierung menschlicher PBL ist steriles Arbeiten. Deshalb wird in einem Sterilraum unter einer Laminair gearbeitet. Vor und nach der Arbeit wird die Arbeitsfläche mit Melsept abgerieben. Sämtliches Einwegverbrauchsmaterial wird steril vom Hersteller geliefert. Glasartikel werden bei 180 °C zweimal sterilisiert. Hitzeempfindliche Materialien, wie Pipettenspitzen, werden bei 120 °C und 1 bar Druck 50 Minuten autoklaviert. Die Gebrauchslösungen werden entweder vom Hersteller steril geliefert oder durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,1µm filtriert.

2.4 Kultivierung von PBL und Chromosomenpräparation

Das Blut wird einem Probanden aus der Armvene direkt in ein mit Heparin beschichtetes Röhrchen entnommen. Zu 0,5 ml Vollblut werden 4,0 ml Medium (McCoy's 5A.) gegeben. Das Medium enthält Kohlenstoffhydrate, essentielle Aminosäuren, Carbonatpuffer, Vitamine und Antibiotika zur Vermeidung von Bakterienwachstum. Zur Wachstumsförderung der Blutzellen werden 0,5 ml fetales Kälberserum (FKS) zugegeben. Die Anregung zur Zellteilung erfolgt mittels Phytohämagglutinin (PHA) (NOWELL, 1960), das in einer Menge von 0,12 ml zugegeben wird. Die so angesetzte Kultur wird bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.4.1 Standardkultur für PBL

Nach 48 Stunden befinden sich die meisten Zellen der Kultur in der ersten Mitose. Etwa drei Stunden vorher, also bereits nach 45 Stunden, wird den Kulturen Colcemid® hinzugegeben. Colcemid® ist ein synthetisches weitaus giftigeres Analog zu Colchizin, welches ein Alkaloid der Herbstzeitlose ist. Es verhindert den Aufbau des Spindelapparates, so dass die Chromosomen in einem Metaphase ähnlichen Stadium (C-Metaphase) arretiert werden. Alle verwendeten Präparate aus dem Blut von Astronauten waren C-Metaphasen (fortan einfach als Metaphasen bezeichnet).

2.4.2 Vorzeitige Chromosomen-Kondensation (PCC)

Für biodosimetrische Untersuchungen wurde die Methode der vorzeitigen Chromosomen-Kondensation (engl.: *premature chromosome condensation*, PCC) schon vor vielen Jahren als geeignet vorgeschlagen (PANTELIA und MAILLIE, 1984). Die Chromosomen können mit Calyculin A, einem Phosphatase-Inhibitor, in jeder Phase des Zellzyklus vorzeitig zur Kondensation gebracht werden (GOTOH *et al.*, 1995). Schäden in der G1-, G2- und M-Phase können daher mit PCC erfasst werden. Die Anzahl erfasster Aberrationen ist in PCC oft höher als in klassischen Metaphasen-Präparationen (GEORGE *et al.*, 2001b).

Im Falle einer schlecht wachsenden Blutkultur können trotzdem vergleichsweise viele Chromosomen in PCC generiert werden. Außerdem bleibt die Auswahl der Zellen für die Untersuchung nicht auf Metaphasezellen konzentriert, was ja eine Selektion der

untersuchten Zellen bedeuten würde (DURANTE *et al.*, 1998). Nach der Bestrahlung wurden die PBL in RPMI 1640 Medium mit 20% FKS Serum, 1% PHA und Antibiotika suspendiert und insgesamt 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach etwa 44 Stunden wurden 400µl Colcemid® dem Medium zugegeben und weitere 4 Stunden inkubiert. Nach einer Kulturzeit von bis dahin 47 Stunden erfolgte die Zugabe von 5µl Calyculin A mit einer Endkonzentration von 50 nM (Stammlösung: 0,1 mM in Ethanol bei -20°C) für 45 Minuten bei 37°C. Dabei kondensieren die Chromosomen vorzeitig. Obwohl PCC auch mit Vollblutkulturen funktioniert, wurden mit isolierten PBL die besten Ergebnisse erzielt (DURANTE *et al.*, 1998). Alle Chromosomen-Präparate zur Untersuchung der Wirkungsweise von schweren Ionen erfolgten mit PCC.

2.5 Chromosomenpräparation

Die Chromosomenpräparation findet nicht unter sterilen Bedingungen statt.

1. Zentrifugieren, 5 min bei 1000 U/min (entspricht 120 g)
2. Absaugen des Überstands auf 900-1000 µl
3. Zugabe von 5ml 5M KCl und 10 min Einwirkdauer (hypotoner Schock)
Aufgrund osmotischer Vorgänge platzen die Erythrozyten. Die PBL hingegen quellen auf und zerplatzen erst beim Auftropfen (vgl. Schritt 12)
4. Zentrifugieren, 5 min bei 1000 U/min (entspricht 120 g)
5. Absaugen des Überstands auf 900-1000 µl
6. Erste Fixierung: Zugabe von 5 ml Fixiergemisch (Methanol und Essigsäure, 3:1) auf einem Schüttler. Bei der ersten Zugabe sollte tropfenweise Fixativ zugegeben werden. Es kommt zur Denaturierung der Proteine. Der Alkohol im Fixativ führt zu Wasserentzug, wodurch die Zellen unter Beibehaltung ihrer Struktur abgetötet werden.
7. Zentrifugieren, 5 min bei 1000 U/min (entspricht 120 g)
8. Absaugen des Überstands auf 900-1000 µl
9. Zweite Fixierung wie unter 6.
10. Zentrifugieren, 5 min bei 1000 U/min (entspricht 120 g)
11. Absaugen des Überstands auf 900-1000 µl
12. Dritte Fixierung wie unter 6.
13. Zentrifugieren, 5 min bei 1000 U/min (entspricht 120 g)

14. Absaugen des Überstands bis auf etwa 500µl

15. Auftropfen der Zellen auf trockene fettfreie Objektträger

Die gequollenen PBL platzen und geben die Chromosomen frei. Diese liegen idealerweise gut gespreitet und in Gruppen zu 46 auf dem Objektträger.

Die freien Hydroxylgruppen des Silicium-Hydroxids des Glasobjektträgers machen die Oberfläche hydrophil und leicht negativ geladen. So können sich die positiven NH_3^+ -Gruppen der Proteine, die mit der DNA in Verbindung stehen, mit der Glasoberfläche verbinden. Eine Eindeckelung ist daher nicht erforderlich.

16. Die Objektträger mit den präparierten Chromosomen (Präparate) werden an der Luft getrocknet. FISH-Färbung sollte erfahrungsgemäß erst einen Tag später erfolgen, um eine gute Hybridisierung zu gewährleisten.

Als Vorbehandlung für FISH wurde gegen unerwünschte RNA und Proteine eine RNase A-Behandlung und eine Behandlung mit Pepsin für die *in situ* Hybridisierung vorgenommen.

2.6 FISH und Giemsa

2.6.1 Verwendete DNA-Sonden

Für die *in situ* Hybridisierungen wurde folgendes Material sowie das entsprechende XCyte Lab Manual (Stand: 2001) der Firma METASYSTEMS[©] GmbH (Robert Bosch Strasse 6, 68804 Altlussheim, Germany) verwendet:

Das 24-Farben mFISH-Kit enthält 24 verschiedene Chromosomen-Sonden entsprechend den 24 menschlichen Chromosomenpaaren. Jede dieser Sonden ist mit einer von fünf verschiedenen Fluorochromen oder einer Kombination aus diesen markiert (Abb. 7).

Verwendete FISH-Kits (a-c):

a. 24XCyte D-0125-120-MC – 24 Farben Kit, 120µl

Lagerung bei –20 °C

Spektren der verwendeten Fluorochrome entsprechen den Farbstoffen FITC, Spectrum Orange[™], Texas Red[®] und DEAC (Diethylaminocoumarin). Als weitere Markierung wurde Biotin verwendet, wofür eine Detektion mit Streptavidin-Cy[™]5 notwendig ist (**B-tect**).

b. XCyte 5 D-0205-120-MC – Chromosom 5 spezifisches mBAND Kit, 120µl

Lagerung bei –20 °C

Chromosom 5 spezifische DNA-Sonden-Mischung, die sich aus teilweise überlappenden regionsspezifischen „Paints“ zusammensetzt, die mit verschiedenen Fluorochromen unterscheidbar markiert sind (Abb. 8). In Kombination mit der Analyse-Software ISIS (engl.: *in situ imaging software*, METASYSTEMS[©]) können Analysen in mFISH und mBAND durchgeführt werden. Spektren der verwendeten Fluorochrome entsprechen den Farbstoffen FITC, Spectrum Orange[™], Texas Red[®] und DEAC.

Als weitere Markierung für mFISH und mBAND wurde Biotin verwendet, das mit Streptavidin-CyTM 5 detektiert wird. Hierfür wird ein B-tect-Kit mitgeliefert.

c. B-tect D-0901-120-NI – Biotin Kit

2x 1000 µl	Blockierungs-Reagenz, Lagerung bei –20 °C
20 µl	Detektion 1+3, Lagerung bei –20 °C
10 µl	Detektion 2, Lagerung bei –20 °C
200 µl	DAPI/Anti-Fade, Lagerung bei 4 °C

Die Gegenfärbung wird mit DAPI durchgeführt. Das Kit mit einem Volumen von 120µl ergibt 10 Hybridisierungen bei Verwendung eines Deckglases in der Größe 22x22 mm oder 16 Hybridisierungen bei einem Deckgläschen von 18x18 mm.

Das Protokoll ist für mFISH- und mBAND-Hybridisierungen gleich. An entsprechender Stelle muss lediglich die gewünschte „Sonden-Mischung“ verwendet werden.

Die Anregungs- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome einschließlich der DAPI-Gegenfärbung, die in der mFISH- oder mBAND-Untersuchung benutzt wurden, sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

Fluorochrom	Anregungs- maximum	Emissions- maximum	Farbe des Fluoreszenz Signals	Farbe des Anregungs- lichts
DEAC	426 nm	480 nm	blau/türkis	blau
FITC	502 nm	530 nm	grün	türkis
Spectrum Orange TM	559 nm	588 nm	gelb	grün
Texas Red [®]	595 nm	615 nm	rot	gelb/orange
Cy TM 5	649 nm	670 nm	fast infrarot	rot
DAPI	345 nm	455 nm	hellblau	violett

Tab. 8: Anregungs- und Emissionsmaxima für FISH-Fluorochrome (METASYSTEMS[©], 2001, 2003).

#	DEAC Ex 426nm/ Em 480nm	FITC Ex 502nm/ Em 530nm	Spectrum Orange™ Ex 559nm/ Em 588nm	Texas Red® Ex 595nm/ Em 615nm	Cy™5 Ex 649nm/ Em 670nm
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
X					
Y					

Abb. 7: Hybridisierungs-Schema für mFISH
(Mit freundlicher Genehmigung von METASYSTEMS®).

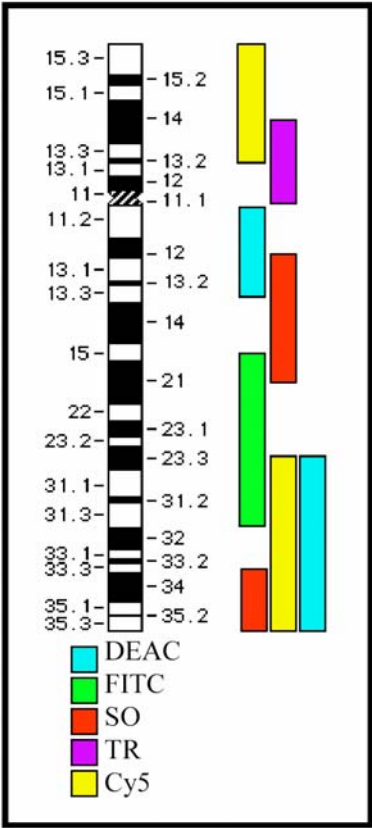


Abb. 8: Hybridisierungs-Schema für mBAND
(Mit freundlicher Genehmigung von METASYSTEMS®).

2.6.2 Ausstattung

- Wasserbad für 37 °C, 70 °C und 75 °C
- Kühltank (4 °C)
- Gefrierschrank (-20 °C)
- Brutschrank (37 °C)
- Mikrozentrifuge
- Küvetten (500 µl)
- Objektträger Küvetten für 70 ml oder 100 ml Füllmenge
- Feuchtekammer
- Mikropipetten: 1 µl - 20 µl, 50 µl - 100 µl, 500 µl - 1 ml
- pH-Meter, Indikatorpapier
- Thermometer bis mindestens 80 °C
- Stoppuhr
- Latex Handschuhe
- Deckgläser 18x18 mm² oder 22x22 mm² oder 24x24 mm²
- Klebstoff zum Versiegeln, beispielsweise Fixogum (Marabu)
- Präparate

2.6.3 Material und Reagenzien

Material für die Behandlung mit RNase A

- 25 mg RNase A in 2,5 ml 2x SSC. Inkubation für 10 min bei 37 °C
- Lagerung in 100 µl Eppendorf Gefäßen bei -20 °C

Material für die Behandlung mit Pepsin

- 1N HCl
- 1xPBS (Phosphat gepufferte Salzlösung: 120 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄ und 2,7 mM KCl, Fertiglösung)
- 70%, 90%, 100% Ethanol
- Pepsin-Vorratslösung: 1g Pepsin (Sigma, P-7012) in 50 ml steril destilliertem Wasser. In 500 µl Vorratsgefäßen kann die Pepsin Vorratslösung bei –20 °C aufbewahrt werden.
- Fixierlösung:
1% Formaldehyd in 1xPBS + 50 mM MgCl₂
60 µl 37% Formaldehyd
2 ml 1x PBS
100 µl 1N MgCl₂
Diese Gebrauchslösung kann bei 4 °C etwa 3-5 Tage aufbewahrt werden.

Material für die Hybridisierung

- *Aqua dest.* (destilliertes Wasser)
- 100% Ethanol
- 1N NaOH (40 g Natriumhydroxid Tabletten/Liter *Aqua dest.* (M = 40,00 g/mol))
- 1xPBS
- Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat-Lösung)
- 20xSSC (Natriumsalz-Zitrat- Puffer, Fertiglösung: 3.0 M NaCl und 0.3 M Natrium-Zitrat, Fertiglösung).
- 4xSSCT (4xSSC + 0,05% Tween 20)
- Pepsin
- 1N HCl (1N Salzsäure)
- 37% Formaldehyd (Formalin)
- 1M MgCl₂ Lösung: 9,52 g MgCl₂ (M = 95,21 g/mol) oder
20,33 g MgCl₂ · 6 H₂O (Magnesiumchlorid-Hexahydrat, M = 203,30 g/mol).
Zugabe von Wasser bis zur Endmenge von 100ml

Behandlung mit Ethanol

Eine Ethanol-Verdünnungsreihe ist notwendig zur Re- und Dehydrierung der Chromosomenpräparate. Der Rehydrierungsprozess stellt sicher, dass die Chromosomen für nachfolgende Wasch- oder Inkubationsschritte entsprechend vorbereitet sind.

2.6.4 mFISH und mBAND

Behandlung mit RNase A

Für die FISH-Färbungen mit DNA-Sonden können sich zwei Bestandteile in den Chromosomenpräparaten als störend erweisen. Dies sind einerseits verschiedene Bestandteile des Zellplasmas, andererseits auch chromosomale Proteine, die eine *in situ* Hybridisierung oder nicht radioaktive Detektion erschweren können (NENNO *et al.* 1994). Ausserdem können auch Reste von RNA im Präparat hinderlich sein, weil die Sonden potenziell auch mit ihnen hybridisieren können und sie damit falsche positive Signale verursachen. Abweichend vom Protokoll von METASYSTEMS[®] (2001) wurde hier eine zusätzliche RNase-Behandlung durchgeführt:

- 125 µl RNase-Lösung pro Objektträger, Abdeckung mit einem großen Deckglas (Parafilm war bei trockenen Präparaten nicht geeignet)
- 1 Stunde in der Feuchtekammer bei 37 °C
- Deckgläser entfernen und die Präparate 3x5 min in 2xSSC bei Zimmertemperatur waschen.

Behandlung mit Pepsin

- 1ml 1N HCl zu 99 ml H₂O bei 37 °C
- 500 µl Pepsin-Vorratslösung zugeben, gut mischen
- Unverzüglich die Präparate in die Lösung geben und inkubieren (2 min für PBL)
- Abweichend vom Originalprotokoll wurde eine Inkubationszeit von 1 min verwendet.
- 3 min Waschen in 1xPBS

- 100 µl der Fixierlösung auf jedes Präparat geben, ein 24x60 mm² Deckglas auflegen und für 10 min bei Zimmertemperatur inkubieren
- 3 min Waschen in 1xPBS
- Dehydrierung in 70%, 90%, 100% Ethanol für jeweils 2 min
- Lufttrocknen der Präparate

Für eine mehrtägige Lagerung sollten die Präparate bei -20 °C eingefroren werden.

Hinweis: Wenn die Pepsin-Behandlung unmittelbar vor der Hybridisierung durchgeführt wird, kann die Ethanolreihe für Dehydrierung und Rehydrierung entfallen. Stattdessen können die Präparate direkt von 1xPBS in das auf 70 °C heiße 2xSSC des nächsten Behandlungsschritts gebracht werden.

Vorbehandlung und Denaturierung der Chromosomenpräparate

- Rehydrierung in 100%, 70%, 50%, 30% Ethanol für jeweils 1 min
- Präparate für 1 min in 0,1xSSC bei Zimmertemperatur behandeln
- Präparate für 30 min in 2xSSC bei 70 °C behandeln
- Küvette mit Objektträger aus dem Wasserbad nehmen und auf 37 °C abkühlen lassen (Dauer etwa 20 min)

Hinweis: Hier kann bereits mit der Denaturierung der DNA-Sonde aus dem nächsten Arbeitsabschnitt begonnen werden!

- Präparate für 1 min in 0,1xSSC bei Zimmertemperatur geben
- Denaturierung für 1 min in 0.07 N NaOH bei Zimmertemperatur
- Präparate für 1 min in 0,1xSSC (4 °C) behandeln
- Präparate für 1 min in 2xSSC (4 °C) behandeln
- Dehydrierung in 30%, 50%, 70%, 100% Ethanol für jeweils 1 min
- Lufttrocknen der Präparate

Sondendenaturierung und Hybridisierung

- Die erforderliche Menge der „Sonden-Mischung“ (für mFISH oder mBAND) in ein Eppendorf Gefäß pipettieren
7 µl für ein 18x18 mm² Deckglas
10 µl für ein 22x22 mm² Deckglas
12 µl für ein 24x24 mm² Deckglas
- Denaturierung der Sonde bei 75 °C für 5 min
- Kurz in Eis abkühlen
- Bei 37 °C für 30 min inkubieren
- „Sonden-Mischung“ kurz zentrifugieren
- Die denaturierte und vorhybridisierte „Sonden Mischung“ auf die denaturierten Chromosomenpräparate pipettieren
- Mit einem Deckglas abdecken
- Die Ränder mit Universalkleber versiegeln
- Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 2-4 Tage

Waschabläufe und Detektion der mit Biotin markierten Sonde mit CyTM5

- Vorsichtiges Entfernen der Versiegelung
- Präparate in 1xSSC (75 °C) für 5 min waschen
- Inkubieren der Präparate in 4xSSCT bei Zimmertemperatur für 5 min

Blockierung

- 50 µl des Blockierungs-Reagenz auf jedes Präparat geben, mit einem 24x60 mm² Deckglas bedecken und bei 37 °C für 10 min inkubieren.
- Deckgläser entfernen und die Präparate kurz in 4xSSCT behandeln

Detektion 1:

- Für jedes Präparat müssen 50 µl Blockierungs-Reagenz und 1 µl „Detektion 1+3“ Reagenz gemischt werden. Anschließend werden 50 µl auf jedes Präparat gegeben und mit einem 24x60 mm² Deckglas bedeckt. Inkubation bei 37 °C für 15 min
- Präparate 2x3 min in 4xSSCT spülen.

Detektion 2:

- Für Signalverstärkung müssen 50 µl Blockierungs-Reagenz und 1 µl „Detektion 2“ Reagenz gemischt werden. Anschließend werden 50 µl auf jedes Präparat gegeben und mit einem 24x60 mm² Deckglas bedeckt. Inkubation bei 37 °C für 15 min
- Präparate 2x3 min in 4xSSCT spülen.

Detektion 3 (vgl. Detektion 1):

- Für jedes Präparat müssen 50 µl Blockierungs-Reagenz und 1 µl „Detektion 1+3“ Reagenz gemischt werden. Anschließend werden 50 µl auf jedes Präparat gegeben und mit einem 24x60 mm² Deckglas bedeckt. Inkubation bei 37 °C für 15 min
- Präparate 2x3 min in 4xSSCT spülen.

Hinweis: Die Detektionen 2 und 3 sind nur notwendig, wenn das CyTM5 Signal zu schwach ist und verstärkt werden muss.

Gegenfärbung mit DAPI:

- 1x3 min in 1xPBS waschen
- Restflüssigkeit ablaufen lassen und Präparate lufttrocknen
- 20 µl DAPI/Anti-Fade auf jeden Objektträger geben
- mit einem 24x60mm² Deckglas bedecken

Die Präparate können bei einer Lagerung von -20 °C für bis zu 6 Monate verwendet werden. Nach eigener Erfahrung eignen sich mBAND Präparate auch noch 2 Jahre später für eine erfolgreiche Analyse.

2.6.5 Hybridisierung mit einer Pan-Zentromer-Sonde

Zur Sicherung der Auswertung wurden Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Abgesehen von dem mBAND gefärbten Chromosom 5 war es manchmal schwierig die Zentromere der übrigen Chromosomen zu erkennen und so DIZ zu entdecken. Deshalb wurde für die Präparate mit Bestrahlungen von 1 Gy 200MeV/n, 1 Gy 500 MeV/n und 4 Gy 500 MeV/n eine Pan-Zentromer-Sonde für FISH eingesetzt.

Vorbereitung der Präparate

Es wurden die bereits beschriebenen Protokolle verwendet:

1. RNase A-Behandlung
2. Pepsin-Behandlung
3. Vorbehandlung und Denaturierung der Chromosomenpräparate

Sonden-Denaturierung

(menschliche Pan-Zentromer-Sonde, PAHC0001-R, Q-Biogene)

- Die notwendige Sondenmenge in ein Eppendorf-Gefäße geben
7 µl für ein 18x18 mm² Deckglas
10 µl für ein 22x22 mm² Deckglas
12 µl für ein 24x24 mm² Deckglas
- Denaturierung der Sonde im Wasserbad bei 94-98 °C, 5 min Hinweis: Die Sonde nach der Denaturierung innerhalb von 15 min verwenden – oder bis zu deren Verwendung auf Eis lagern
- Die denaturierte Sonde auf die denaturierten Chromosomenpräparate pipettieren
- Mit einem Deckglas abdecken
- Die Ränder mit Universalkleber abdichten
- Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 1 Tag

Waschabläufe

- Präparat in 1xSSC (68 °C) 5 min waschen
- Präparat in 1xPBS für 3 min (Zimmertemperatur) waschen
- Präparat lufttrocknen

Gegenfärbung mit DAPI:

- 20 µl DAPI/Anti-Fade auf die Objektträger geben
- mit einem 24x60 mm² Deckglas bedecken

2.6.6 Giemsa-Färbung

Material

5% Giemsa-Stammlösung

95% Phosphatpuffer (für 1 Liter: 8,895 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ und 3,4 g KH_2PO_4)

Durchführung

- Mischung von Giemsa-Stammlösung und Phosphatpuffer
- Filtration der Lösung durch einen Standardfilter in eine Küvette
- Färben der Präparate für 10 min
- Waschen in *Aqua dest.*

2.7 Aufnahme und Auswertung der Präparate

Die fotografischen Aufnahmen der Mitosen nach mFISH, mBAND und Pan-Zentromer-Färbung erfolgte mit Hilfe einer CCD Kamera IMAC CCD S30 (ungekühlt) an einem OLYMPUS BX50 oder BX60 Fluoreszenzmikroskop (Objektiv: UPlan Apo / 100x/1,35 Oil und OLYMPUS Immersionsöl). Integriert ist ein manuelles Fluoreszenzfilterrad für die verwendeten Fluorochrome DAPI, FITC, CyTM5, Texas Red[®], Spectrum OrangeTM und DEAC.

Die Aufnahmeeinheit des Mikroskops war an ein DELL Computersystem (DELL, PentiumIII 500 MHz, 128 MB, Windows 95) gekoppelt. Als Analysesoftware wurde ISIS 4.4.7 eingesetzt. Die spätere grafische Aufbereitung der Bilder für Präsentationszwecke erfolgte mit PhotoImpact 6 und 8 (ULEAD SYSTEMS[©]). Die Verarbeitung der Daten wurde an einem weiteren PC (FUJITSU-SIEMENS, Pentium[©] III 800 MHz, 256 MB, Windows XP Professional mit MS Office XP Professional, MICROSOFT[©]) durchgeführt.

2.7.1 Bildtechnische Arbeitsschritte

Mit Fluorochromen markierte Verunreinigungen können entfernt werden, damit die Darstellungsqualität erhöht wird. Die Einstellung des Objektschwellenwertes stellt sicher, dass für die Farbdarstellung nur die notwendigen Anteile in die Farbkalkulation einbezogen werden. Zu starke Veränderungen in der Objektschwelle können das Bild negativ beeinflussen. Zur besseren Betrachtung kann das Bild der Metaphase oder die Chromosomen auch vergrößert werden. Diese bildtechnischen Maßnahmen haben keinen Einfluss auf die Darstellung der einzelnen Fluoreszenz-Farben, wohl aber auf die Darstellung der Falschfarben.

2.7.2 Kontrolle der einzelnen Fluoreszenz-Farben

Entsprechend den Vorgaben der Hybridisierung-Schemata für mBAND und mFISH wurden die Präparate in der Fluorochrom-Ansicht auf ihre ordnungsgemäße Hybridisierung untersucht. Aberrationen, etwa Translokationen, sind in mFISH am Fehlen des Fluorochroms innerhalb eines Chromosoms zu erkennen. Bei Verwendung von mBAND werden Inversionen in Form von Lücken und Verdopplungen des

Hybridisierungs-Schemas angezeigt. Weil Falschfarbenbilder Fehlinformationen liefern könnten, ist bei komplexen Aberrationen eine zuverlässige Auswertung nur über diese Fluoreszenz-Bilder möglich.

2.7.3 Kontrolle der Falschfarben-Darstellung

Die Anzeige der Falschfarben gibt einen vereinfachten Überblick über die Chromosomen. Im Falle von mFISH werden die Chromosomenpaare in jeweils anderen Falschfarben dargestellt (Abb. 13a), so dass Translokationen leichter zu erkennen sind als in der original Fluorochrom-Ansicht (Abb. 13c). Bei mBAND wird das Chromosom gebändert dargestellt. Intrachange lassen sich sehr leicht an einer geänderten Reihenfolge der Banden erkennen. Interchange zeigen sich deutlich gegenüber den DAPI-Chromosomen.

Infolge von Kalibrierungstoleranzen, Vergrößerung des Bildes oder Einstellung des Schwellenwertes kann die Falschfarben-Darstellung verwirrende oder inkorrekte Informationen liefern. Aus diesem Grund muss die Falschfarben-Darstellung in jedem Fall mit Hilfe der einzelnen Fluorochrome und des Emmissionsspektrums überprüft werden (Abb. 12g). Für eine bessere Übersicht bei Präsentationen können die DAPI-Fragmente beispielsweise einheitlich blau eingefärbt werden (Abb. 12g/rechts). Der verwendete Experimenttyp in ISIS wurde auf die Darstellung von 23 Falschfarben-Banden kalibriert.

2.7.4 Auswertung der CA und statistische Erfassung

Die Auswertung wurde computerunterstützt am Mikroskop durchgeführt. Die Protokollierung der Aberrationen erfolgte mit Hilfe eines selbst entwickelten Systems für mBAND. Ein ähnliches System befindet sich in Veröffentlichung (HORSTMANN und OBE, 2003). Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt:

1. Dosis-Effekt Beziehungen
2. Bestimmung relativer Bandenlängen und Längen interstitieller Fragmente in mBAND
3. Bruchpunktlokalisation und Bruchverteilungen in mBAND
4. Analyse von Intrachangen und Interchangen
5. Auswertung von CA in PBL von Astronauten

Die Fehlerbalken in den Statistiken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes. Signifikante Abweichungen vom Erwartungswert wurden bei Berechnung von Bruchereignissen pro Bande mit Hilfe des χ^2 -Tests ($p < 0,01$) bestimmt. Gleiches gilt für die Zahl der CA bei PBL von Astronauten. Für eine Abweichung von der Poisson-Verteilung für die Anzahl der Brüche in den erfassten Aberrationen wurde der Dispersionsindex erstellt und mit dem u-Test (EDWARDS *et al.*, 1979) auf Signifikanz überprüft (u-Test, Poisson-Verteilung: $u > -1,96$ und $< 1,96$). Für die Berechnung der Signifikanz verschiedener Aberrationsquotienten, wie etwa für intra-/inter-arm Intrachange (G-Quotient), kam Students t-Test ($p < 0,01$) zur Anwendung.

2.7.5 Dosis-Effekt Beziehung

CA oder aberrante Zellen wurden bei Verwendung verschiedener Strahlendosen und Strahlenenergien verglichen.

2.7.6 Bestimmung der relativen Bandenlänge in mBAND

Die Bandenlänge ist unter anderem abhängig vom Kondensationsgrad des Chromosoms (METASYSTEMS[®], 2003). Für die Bestimmung der Bandenlänge wurden zwanzig ungeschädigte Chromosomen und deren Banden aus den Präparaten der 4 Gy Bestrahlung in ISIS relativ vermessen. Der Mittelwert dieser Daten für jede Bande diente als Grundlage für weitere Berechnungen und zur Bestimmung der relativen Gesamtlänge von Chromosom 5. Die Bandenlängen wurden anteilig auf die Gesamtlänge umgerechnet. Eine Überprüfung ergab, dass die ermittelten Bandenlängen auch auf die Präparate der übrigen Ionen-Bestrahlungen anwendbar waren. Bei den Messungen blieben der Experimenttyp sowie der Falschfarben-Klassifikator in ISIS unverändert.

Die Länge interstitieller Chromosomenfragmente wurde ermittelt, indem die relative Länge für jede einzelne Bande addiert wurde. Die Gesamtzahl der gefundenen interstitiellen Fragmente enthält fusionierte und nicht fusionierte Fragmente, invertierte Fragmente und Translokationen. Für die Auswertung wurden azentrische interstitielle Fragmente und zentrische Fragmente bestimmt, die an beiden Telomeren einen Chromosomenstückverlust zeigten.

2.7.7 Bruchpunktlokalisierung und Bruchverteilung

Eine Lokalisation der Bruchpunkte in mBAND hybridisierten Präparaten erfolgte in SORBs in den Falschfarbenbanden. Unter der Annahme, dass dicht ionisierende Strahlen viele DSB dosisunabhängig erzeugen, wurden Daten aus Bestrahlungen mit 0,5 Gy, 0,75 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 4 Gy zusammengefasst.

Die Bruchereignisse wurden meist zwischen zwei Banden lokalisiert. Nur die terminalen Banden 1 und 23 zeigten häufiger Brüche innerhalb der Bande. Zur Erstellung der Statistik wurden die Ergebnisse um eine Position verschoben. Das bedeutet, dass SORBs, etwa zwischen Bande 3 und 4, der Bande 3 zugeordnet wurden. Brüche in Bande 1 und zwischen Bande 1 und 2 wurden Bande 1 zugeordnet. Analog war es bei Brüchen zwischen Bande 22 und 23 und in Bande 23, die in Bande 22 zusammengefasst wurden.

Für den eher seltenen Fall, dass eine interstitielle Bande in zwei Teilen dargestellt wurde, ist der Bruch immer zur der nächsten vollständigen Bande gezählt worden, die mit dem kürzeren Abschnitt der unterbrochenen Bande verbunden war.

Damit eine Signifikanz bei der Auszählung der Brüche nachgewiesen werden konnte, erfolgte die Berechnung im Verhältnis zur relativen Bandenlänge. Würde man alternativ halbe Bandenlängen (Beispiel: $\frac{1}{2}$ Bande 12 + $\frac{1}{2}$ Bande 13) bei der Bruchpunktbestimmung verwenden, dann entsteht ein mathematischer Fehler bei der Berechnung des Verhältnisses zwischen Bandenlänge und Anzahl der Brüche, weil die Banden verschiedene Längen haben, aber die Messungenauigkeit für jedes Bruchereignis zwischen zwei Banden gleich ist. Wenn man mit dieser Methode eine ähnliche Aussage über das Verhältnis zwischen Brüchen und Länge erhalten möchte, müsste man für eine Bande 0 und eine Bande 24 Werte für Länge und Bruchereignisse angeben. Häufungen von Bruchereignissen (*Hot Spots*) beziehen sich nur auf die Falschfarbbanden. Exakte Bruchpunktlokalisationen können nur über die Emmissionsspektren erfolgen (JOHANNES, 1999). Bruchverteilungen in p-Arm und q-Arm von Chromosom 5 wurden zur physikalischen Länge der beiden Arme (MORTON, 1991) in Beziehung gesetzt und mit dem χ^2 -Test ($p < 0,01$) auf Signifikanz geprüft. Für die Bruchverteilung pro Chromosom wurde für die erfassten CA der Dispersionsindex berechnet und mit dem u-Test (EDWARDS *et al.*, 1979) auf Signifikanz geprüft.

2.7.8 Klassifizierung der CA

Als Inversionen werden hier auch invertierte Bereiche verstanden, die terminal enden und/oder an welchen wiederum ein anderes DAPI-Chromosom transloziert ist. Obwohl bei mBAND die Bestimmung einer klassischen Insertion nicht immer eindeutig ist, wird trotzdem der Begriff „Insertion“ verwendet, weil der entsprechende Abschnitt zwischen zwei weiteren Fragmenten liegt. Ob diese Fragmente ursächlich zum gleichen Chromosom gehören, bleibt bei stark fragmentierten Zellen fraglich. Es besteht die Möglichkeit einer komplexen Translokation zwischen drei oder mehr Chromosomen. Bei einseitigen terminalen Translokationen ist es möglich, dass es sich trotzdem um reziproke Translokationen handelt, wenn die Größe des fehlenden Gegenstückes unterhalb der sichtbaren Auflösung liegt (OBE *et al.*, 2002). Durch Kombination verschiedener Nachweismethoden war es möglich, den Anteil der terminalen Translokationen bei einer Dosis von 4 Gy Röntgenstrahlen auf weniger als 5% aller Translokationen zu bestimmen (FOMINA *et al.*, 2000). Die Einteilung der CA folgt den Beschreibungen aus dem einleitenden Kapitel.

2.8 Bezugsquellenverzeichnis

20xSSC	Gibco/BRL, Eggenstein
24XCyte (mFISH)	MetaSystems, Altlussheim
B-tect Kit	MetaSystems, Altlussheim
Calyculin A	Wako Chemicals, Japan
CCD-Kamera IMAC CCD S30	Compulog Computer Systems GmbH, Böblingen
CCD Camera: IMAC CCD S30	MetaSystems, Altlussheim
Colcemid	Ciba, Basel oder Wako Chemicals, Japan
Computer Dell Optiplex <i>(IBM komp. PC, PentiumIII 500 Mhz, 128 MB RAM)</i>	Dell Computer GmbH, Langen
Computer Fujitsu-Siemens T-Bird <i>(IBM komp. PC, PentiumIII 800 Mhz, 256 MB RAM)</i>	Fujitsu-Siemens Computer GmbH, München
CO ₂ -Brutschrank	Heraeus, Hanau
DAPI/Anti-Fade Kit	MetaSystems, Altlussheim
FKS	Gibco/BRL, Eggenstein
Formamid	Merck, Darmstadt
Giemsa-Farblösung	Merck, Darmstadt
McCoy's 5A-Medium	Gibco/BRL, Eggenstein
MC-Filtersystem für Olympus BX50 mit <i>DAPI/FITC/CyTM5/TexasRed[®]/ SpectrumOrangeTM/DEAC</i>	AHF Analysentechnik, Tübingen
Melsept	Braun, Melsungen
Mikroskop (BX50/BX60) mit <i>Objektiv: UPlan Apo / 100x /1,35 Oil und Immersionsöl</i>	Olympus, Hamburg
Objektträger	Menzel, Braunschweig
PAN-Zentromer-Sonde (PAHC0001-R)	QBiogene, Heidelberg
Parafilm	American Can Company, USA
PBS	Seromed, Berlin

Penicillin	Seromed, Berlin
PHA (Phytohämagglutinin)	Invitrogen, Heidelberg
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Quecksilberlampe USHIO USH-102D 100Watt	Olympus, Hamburg
RNase A (Kat.Nr.: 0109142)	Roche Diagnostics, Mannheim
RPMI 1640 Medium	Gibco-BRL, Grand Island, New York, USA
Software: Windows 95b, Office XP	Microsoft, München
Software: ISIS 4.4.7	MetaSystems, Altlussheim
Software: PhotoImpact 6 und 8	Ulead Systems GmbH, Kaarst
Sterile Kunststoffartikel	Greiner, Nürtingen
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
Tween-20	Merck, Darmstadt
Vacutainer CPT	Becton-Dickinson, Lincoln Park, USA
XCyte 5 (mBAND)	MetaSystems, Altlussheim
Zentrifuge (Sepatech, Labofuge A)	Heraeus, Hanau

3. Ergebnisse

3.1 Übersicht

Ein Ziel der Arbeit war ein Auswertesystem zu entwickeln, das in der Lage ist, CA von mBAND hybridisierten Chromosomen zu beschreiben und für nachträgliche Analysen in geeigneter Form schriftlich festzuhalten. Eine Abmessung der relativen Bandenlängen für Chromosom 5 diente als Grundlage für die Analyse von Chromosomenbrüchen, interstitieller Fragmentlängen und deren Lokalisation. Weil die unterschiedlichen FISH-Techniken, verschiedene Vor- und Nachteile besitzen, erfolgten teilweise auch vergleichende FISH-Untersuchungen der Strahleneffekte, damit die Ergebnisse überprüft werden konnten. Vergleiche und Verhältnisse von Interchangen und Intrachangen geben eine Übersicht über die Strahlenwirkung und sollen Ereignisse aufzeigen, die typisch für Bestrahlungen mit schweren Fe-Ionen sein könnten. Vergleichende Untersuchungen an PBL von Astronauten der internationalen Raumstation ISS für jeweils einen Kurzzeitflug und einen Langzeitflug mit den genannten Methoden schließen die Arbeit ab.

Alle CA oder aberrante Zellen beziehen sich immer auf Chromosom 5. Unter Berücksichtigung eigener veröffentlichter Daten bei JOHANNES *et al.* (2003) sind die meisten Berechnungen auf 1 gesetzt [$1 \equiv 100\%$]. Die Untersuchungen mit der mBAND-Hybridisierung wurden stets für Chromosom 5 durchgeführt. Die unbestrahlten Kontrollpräparate zeigten keine Aberrationen in Chromosom 5 und sind deswegen in den Diagrammen nicht abgebildet. Wegen der geringen Anzahl ausgewerteter Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy und 3 Gy wurden die Ergebnisse bei diesen Dosen nur eingeschränkt verwertet.

3.2 Ein Auswertesystem für mBAND

Für die Beschreibung komplexer CA in mit mBAND gefärbten Chromosomen reichten bisherige Klassifizierungssysteme nicht aus. Es wurde daher ein Verfahren entwickelt, dass diesen Anforderungen genügt und gleichzeitig die Übersichtlichkeit vorhandener Nomenklaturen oder Auswerteverfahren berücksichtigt. Dies soll helfen, die komplexe Auswertung schriftlich so zu protokollieren, dass auch später Analysen oder Durchsichten der Daten möglich sind.

Ein wesentlicher Bestandteil der Nomenklatur ist die Angabe der Banden des hybridisierten Chromosoms. Dabei ist zu beachten, dass die Anzahl der Banden von der Hybridisierungsqualität und Softwarebenutzung abhängig ist und somit laborspezifisch variabel sein kann. METASYSTEMS empfiehlt 23 Banden für Chromosom 5, sofern dies möglich ist. Bei wenigen Banden nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, dass Brüche innerhalb einer Bande dargestellt werden, was bei einer höheren Auflösung mit einer größeren Anzahl von Banden eher selten oder gar nicht vorkommt. Die Lokalisation von Bruchpunkten in Korrelation zur Anzahl verwendeter Banden kann deswegen ebenfalls laborspezifisch sein. Zur Feststellung von Bruchsignifikanzen reicht diese Methode aus.

Eine Variante des nachstehend beschriebenen Auswertesystems wird unter dem Namen „CABAND: Classification of Aberrations in Multicolor Banded Chromosomes“ veröffentlicht (HORSTMANN und OBE, 2003). Hierfür wurden Anpassungen an international verwendete Begriffe und Abkürzungen vorgenommen, damit anderen Nutzern der Zugang zu diesem System erleichtert wird. Zusätzlich zu den hier vorgestellten Abbildungen sind dort noch weitere vorhanden.

Die Beschreibung der CA ist so gewählt, dass eine schnelle Auswertung mit Hilfe einer speziellen Auswerteliste möglich ist. Dabei spielten optische und zähltechnische Überlegungen eine Rolle. Aus diesen Gründen wurden Abkürzungen verwendet, die aber nicht den Bezeichnungen der ISCN Nomenklatur (ISCN, 1995) entsprechen.

Die Gesamtzahl der Banden aus der entsprechenden Untersuchungsreihe (hier: 23 Banden) kann zu Beginn einer Auswertung generell genannt werden, sie kann aber auch jeder Aberrationsbeschreibung vorangestellt werden.

Wenn eine Zelle als aberrant erkannt wird, sieht man bei mBAND im Überblick Translokationen, Fragmente, Ringe oder Inversionen. Fragmente werden als „frag“ (engl.: *fragment*), fusionierte Fragmente als „frag (f)“ (engl.: *fused*) bezeichnet. Unter „Fragment“ werden an dieser Stelle alle chromosomalen Segmente verstanden, die wegen eines fehlenden Zentromers bei der nächsten Zellteilung verloren gehen würden. Wie bei der *PAINT*-Nomenklatur (TUCKER *et al.*, 1995; SAVAGE und TUCKER, 1996), werden Translokationen allgemein unter „t“ zusammengefasst.

In Kombination mit verschiedenen anderen Abkürzungen wird die Aberration beschrieben (TUCKER *et al.*, 1995; JOHANNES *et al.*, 1999). „t“ steht in diesem Fall für eine einseitige Translokation (engl. *translocation*). Eine reziproke Translokation erhält den Zusatz „t-rec“ (engl.: *reciprocal*), ein DIZ „t-dic“ (engl.: *dicentric*) und eine Insertion „t-ins“ (engl.: *insertion*). Bei der Auswertung der Gesamtzahl aller Translokationen ist darauf zu achten, dass fusionierte Fragmente auch Translokationen sind, so dass sie in diesem Fall zu den unter „t“ gezählten Translokationen hinzugezählt werden müssen.

Basierend auf der *PAINT*-Nomenklatur werden zentromerhaltige Chromosomenanteile mit Großbuchstaben und solche ohne Zentromer mit Kleinbuchstaben bezeichnet. Daher werden perizentrische Ringe mit „R“ und parazentrische Ringe mit „r“ abgekürzt. Gleiches gilt für perizentrische Inversionen, die mit „Inv“ und parazentrische Inversionen, die mit „inv“ angegeben werden. Es folgt die Angabe des Chromosomenabschnittes mit „B“ oder „b“, je nachdem, ob ein Zentromer enthalten ist oder nicht. Ist in der CA, etwa bei einer Insertion, ein DAPI markiertes Fragment enthalten, wird dieses entsprechend mit „D“ oder „d“ zuerst genannt, bevor Angaben zum gebänderten Chromosom erfolgen.

Die Bezeichnungen „ter“ für terminale (engl.: *terminal*) oder „int“ für interstitielle (engl.: *interstitial*) Chromosomenabschnitte bezeichnen, unabhängig von der verwendeten Bandenzahl, anschließend die Position des zu beschreibenden Chromosomentails. Die Redundanz des Codes an dieser Stelle gibt die Möglichkeit, auch ohne Bandenangabe noch eine Rekonstruktion der aberranten Metaphase in Hinblick auf das gebänderte Chromosom zu ermöglichen, etwa bei Vergleich solcher Untersuchungen von Chromosomen, die mit verschiedener Bandenanzahl erstellt wurden. Weiter wird die Beteiligung von p- oder q-Arm angegeben. Ereignisse, die beide Arme gleichzeitig betreffen, werden mit „pq“ beschrieben. Nachstehende Bandenangaben werden so aufgeführt, wie sie zusammengesetzt sind. Sollte der Bruch

innerhalb einer Bande liegen, so werden beide Teile unter Nennung dieser Bande beschrieben. Zur Beschreibung eines Bruchpunktes, der zwischen 2 Banden liegt, erfolgt die Entscheidung in Richtung der Bande, an der sich der kleinere Abschnitt der gebrochenen Bande befindet.

Im Falle einer Inversion zeigt die umgekehrte Zahlenfolge, wo sich die Inversion befindet (Beispiel: 1-12/16-13/17-23). Anschließend folgt die Zahl der Bruchereignisse, die im Sinne der „*Breakage First Hypothese*“ für diese CA notwendig sind. Es werden nur Brüche am gebänderten Chromosom gezählt, weil dieses den größten Informationsgehalt liefert. Bei stark fragmentierten DAPI-Chromosomen lassen sich terminale oder interstitielle Fragmente, wenn sie mit dem mBAND Chromosom terminal fusioniert sind, nicht mehr unterscheiden, so dass es zu falschen Berechnungen bei der Bestimmung der Bruchanzahl kommen kann. Wenn in mBAND-Präparaten die Chromatiden sichtbar sind (Abb. 9), können für die Beschreibung von CTA ergänzend die betroffenen Chromatiden mit „pc1“ und „pc2“ für die Chromatiden des p-Armes und „qc1“ und „qc2“ für die Chromatiden des q-Armes beschrieben werden. Die Zuordnung von „1“ und „2“ ist frei wählbar und dient nur der Übersicht in der CA. CTA wurden nicht analysiert.

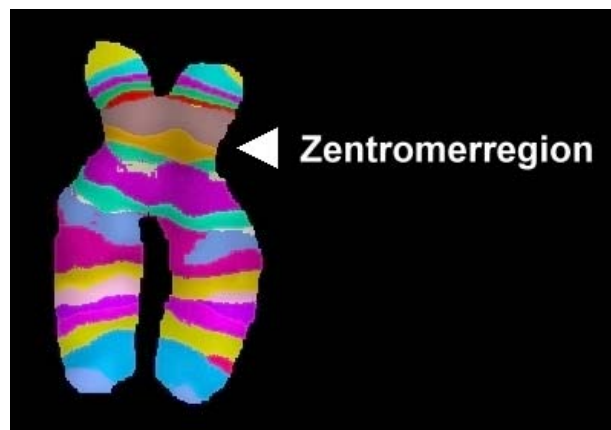


Abb. 9: Chromosom 5 mit Chromatidendifferenzierung in Falschfarben-Darstellung in mBAND.

In der nachstehenden Tab. 9 sind die verwendeten Abkürzungen zusammengefasst:

Allgemeine Angaben	Abkürzung
gebändertes Chromosom ohne (b) Zentromer/mit (B) Zentromer	b/B
<u>D</u> API markiertes Chromosom ohne (d) /mit (D) Zentromer	d/D
<u>D</u> API markiertes DIZ	DD
terminal	ter
interstitiell	int
p-Arm	p
q-Arm	q
Chromatiden des p-Armes	pc1 oder pc2
Chromatiden des q-Armes	qc1 oder qc2
Chromosomenaberrationen	Abkürzung
freies Fragment	frag
fusioniertes Fragment	frag (f)
Translokation , einseitig	t
Translokation, reziprok	t-recp
Translokation, dizentrisch	t-dic
Translokation, insertiert	t-ins
perizentrische Inversion/parazentrische Inversion	Inv/inv
zentrischer Ring / azentrischer Ring	R/r

Tab. 9: Nomenklaturschlüssel für die Klassifizierung von CA in mBAND.

Beispiel: 23frag: b-int-q12-18 |2

= **F**ragment (azentrisch und gebändert) (**b**) (**i**nterstitieller Herkunft),
aus dem **q**-Arm die Banden **12-18** enthaltend. Zwei Brüche am
gebänderten Chromosom sind für diese CA notwendig.

Informationen über die Banden 1-11 und 18-23 brauchen für das obige Beispiel nicht genannt werden, weil keine weiteren Informationen über die CA darin enthalten sind. Für den Fall, dass es sich nicht um Einzelfragmente sondern um Translokationen handelt, muss beschrieben werden, mit welchen anderen Chromosomen die Anteile assoziiert sind. In den meisten Fällen wird es sich um eine Translokation mit einem

DAPI-Chromosom handeln. Aber auch Translokationen zwischen den beiden gebänderten Chromosomen sind möglich.

23frag (f): b-int-q12-18/d |2

= **F**ragment (**f**usioniert und (azentrisch und gebändert(**b**)), **i**nterstitieller Herkunft aus dem **q**-Arm die Banden **12-18** enthaltend, das an ein DAPI-Fragment ohne Zentromer (**d**) angelagert ist.

Beispiel eine Komplettbeschreibung einer aberranten Metaphase:

23frag (f): b-int-q12-18/d | 2

23frag: b-ter-q19-23 | s.o.

Die Abkürzung „s.o.“ (siehe oben) verweist auf die vorherige Zeile, weil dort die theoretisch erforderlichen Bruchereignisse bereits angegeben wurden. Auf diese Weise soll eine Doppelzählung von Brüchen vermieden werden.

Das verbleibende zentrische Fragment mit Banden 1-11 wird nicht aufgeführt, sofern es nicht in eine weitere Aberration verwickelt ist. Im Falle einer Translokation eines azentrischen DAPI-Fragmentes an das zentrische Fragment müsste im obigen Beispiel noch ergänzt werden: 23t: B-ter-pq1-11/d |s.o

3.2.1 Beispiele für CA und ihre Klassifizierung

Für die spätere Beschreibung in einer Tabelle wurden die Einzelbeispiele von Abb. 10 und Abb. 11 fortlaufend beschriftet.

3.2.1.1 Schemata für CA in mBAND

Die Abb. 10 zeigt schematisch ein ungeschädigtes Chromosom 5 sowie einige CA mit typischer mBAND-Bänderung in Falschfarben-Darstellung.

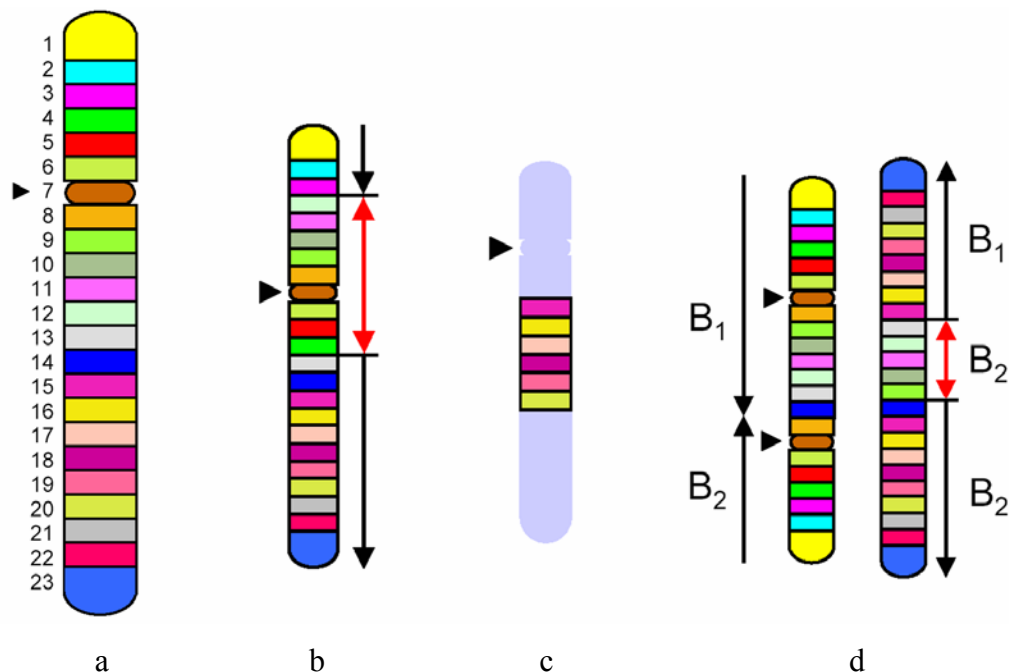


Abb. 10: Schemata für CA in mBAND. a-d. Einzelne Pfeilspitzen kennzeichnen die Region des Zentromers, gestielte Pfeile kennzeichnen Chromosomenbereiche und geben in der Reihenfolge aufsteigend die Banden an. Rote Doppelpfeile markieren invertierte Bereiche.

a. ungeschädigtes Chromosom.

b. Perizentrische Inversion der Banden 4-12.

c. Insertion der Banden 15-20 zwischen zwei DAPI-Fragmenten.

d. Homologes DIZ. Die Banden 1-14 von Chromosom B₁ sind mit den Banden 8-1 von Chromosom B₂ fusioniert. Die Banden 23-14 von B₂ sind fusioniert mit den invertierten Banden 9-13 von B₂, die wiederum mit den Banden 15-23 von B₁ verbunden sind.

3.2.1.2 CA in mBAND

Die folgende Abb. 11 zeigt CA, die auf der Falschfarbenberechnung von ISIS zur Darstellung in mBAND basieren.

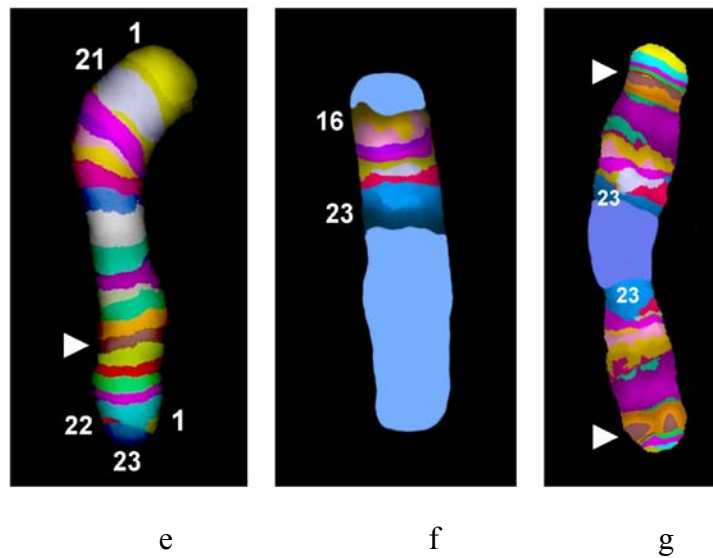


Abb. 11: CA in mBAND. (Falschfarben-Darstellung (e-g)) Pfeilspitzen kennzeichnen die Region des Zentromers. DAPI-Fragmente sind blau eingefärbt.

e. Perizentrische Inversion der Banden 1-21

f. Insertion der Banden 16-23 zwischen zwei DAPI-Fragmenten. Das Restfragment von Bande 23 wurde nicht gefunden.

g. Homologes DIZ. Bande 23 ist bei beiden Chromosomen gebrochen. Beide Chromosomen werden von einem interstitielles DAPI-Fragment verbunden. Verbleibende Fragmente von Bande 23 wurden nicht gefunden.

3.2.2 Auswertetabelle

Der Code für die Auswertung der in Abbildung 10 (a-d) und 11 (e-g) dargestellten CA kann auch in eine dafür vorgesehene Tabelle (Tab. 10) eingetragen werden, um die spätere Auswertung zu vereinfachen.

Nr.	Bild	Aberration	DAPI	mBAND-Chromosom	DAPI	mBAND-Chromosom	Brüche	5.1/5.2
1	a	keine						
2	b	Inv		B-int-pq4-12			2	5.1
3	c	t-ins	D	b-int-q15-20	d		2	5.1
4	d	t-diz		B ₁ -ter-pq1-14		B ₂ -ter-q8-1	1+1	
		frag(f) + inv		B ₁ -ter-q23-15		B ₂ -int-q13-9		
				B ₂ -ter-q14-23			s.o. + 1	5.1/5.2
5	e	inv		B-int-pq1-21			2	5.1
6	f	t-ins	d	b-int-q16-23	d		2	5.1
7	g	t-diz		B ₁ -ter-pq1-23	d	B ₂ -ter-pq23-1	2	5.1/5.2

Tab. 10: Auswertetabelle für mBAND. Beispiele aus Abb. 10 (a-d) und Abb. 11 (e-g) sind eingefügt.

Unter „**Nr.**“ wird die fortlaufende Nummer angegeben. Die Angaben bei „**Bild**“ entsprechen der Bildnummer, etwa aus der ISIS Software. **Aberration** kennzeichnet den Aberrationstyp, wie etwa „frag“ oder „inv“. **DAPI** beschreibt das DAPI-Chromosom mit Zentromer (D) oder ohne Zentromer (d). Unter „**mBAND-Chromosom**“ folgt die Aberrationsbeschreibung des gebänderten Chromosoms. Bei „**Brüche**“ wird die Anzahl der sichtbaren Brüche der CA eingetragen, wobei „s.o.“ (= siehe oben) auf ein bereits gezähltes Bruchereignis in der CA hinweist. Die Homologen werden als „**5.1/5.2**“ unterschieden. So kann man später schnell feststellen, welche Beschreibung zu welchem Chromosom gehört und ob beide Chromosomen aberrant sind oder nicht.

3.3 Beispiele für CA in FISH

In den nachstehenden Abb. 12, 13 und 14 werden Beispiele von ungeschädigten und geschädigten Chromosomen gezeigt, die mit verschiedenen FISH-Methoden analysiert wurden. Zusätzlich werden in Einzelfällen die Chromosomen in den Fluorochrom-Einzelfarben abgebildet, die als Grundlage zur Berechnung der Falschfarben dienten.

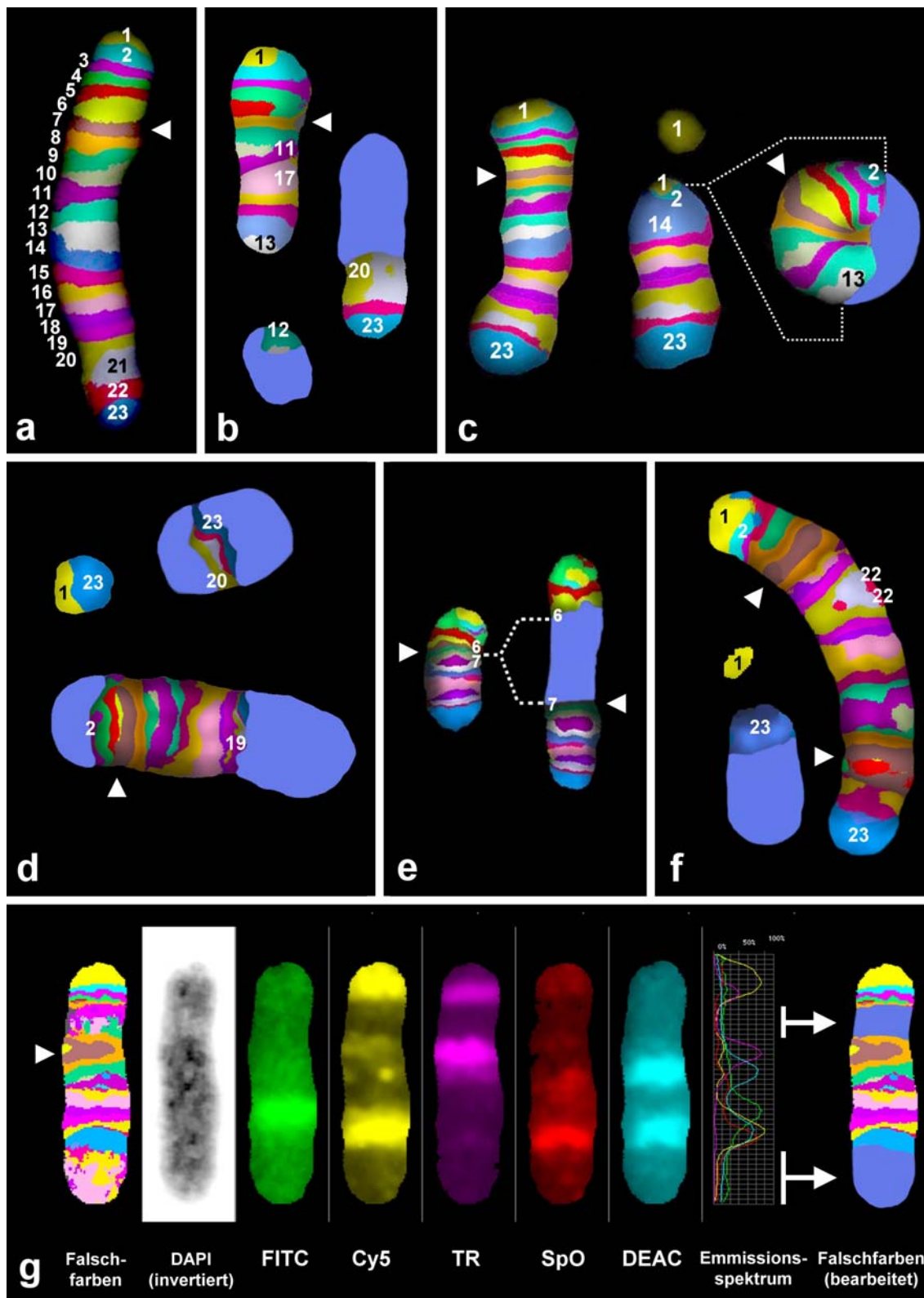


Abb. 12: CA in mBAND nach Bestrahlung mit Fe-Ionen (500 MeV/n).

a. Ungeschädigtes Chromosom 5 mit 23 Banden in Falschfarben-Darstellung. b-g: Aberrationen in Chromosom 5 detektiert mit mBAND nach Bestrahlungen mit Fe-Ionen (500 MeV/n) (b. 0,5 Gy; c. 0,75 Gy; d. 4 Gy; e. 1 Gy; f. 4 Gy). Alle anderen Chromosomen sind einheitlich mit DAPI gefärbt und werden in b-f blau hervorgehoben. Bild g zeigt ein Beispiel, bei dem zur Ermittlung der DAPI-Fragmente die Auswertung der Fluorochrome und des Emmissionspektrums notwendig ist.

Pfeilspitzen kennzeichnen die Zentromerregion. Gestielte Pfeile in g kennzeichnen DAPI-Regionen. Rechts ist eine bearbeitete Falschfarbendarstellung zu sehen, die aus den Angaben des Emmissionsspektrums resultiert.

b. Inversion der Banden 13-17, die mit Bande 11 fusioniert ist (oben links). Das interstitielle Fragment von Bande 12 (unten) und die terminalen Banden 20-23 (rechts) sind mit DAPI-Fragmenten fusioniert.

Kurzbeschreibung: inv: B-ter-pq1-11/b-int-q17-13| 3
frag(f): b-int-q12/d| s.o.
frag(f): d/b-ter-q20-23| s.o

c. Ungeschädigtes Chromosom 5 (links). Terminales Fragment von Bande 1 (oben Mitte). Die interstitiellen Banden 2-13 bilden ein Ringchromosom, in das wiederum ein DAPI-Fragment inseriert ist.

Kurzbeschreibung: frag: b-ter-p1| 1
frag(f): b-ter1-2/b-ter-q14-23| 2
t-ins, R: B-int-pq2-13/d| s.o.

d. Fusionierte Fragmente der terminalen Banden 1 und 23 (oben links). Die Banden 20-23 und Banden 2-19 sind jeweils von DAPI-Fragmenten umgeben (unten). Diese Aberration kann als einfache Insertion oder als komplexe Translokation zwischen mehreren verschiedenen Chromosomen interpretiert werden.

Kurzbeschreibung: frag: b-ter-p1/b-ter-q23| 2
frag(f): d/b-int-q20-23/d| 2
t-ins: d/B-int-pq2-19/d| s.o.

e. Ungeschädigtes Chromosom 5 (links). Insertion eines interstitiellen azentrischen DAPI-Fragments zwischen Bande 6 und 7 (rechts).

Kurzbeschreibung: t-ins: b-ter-p1-6/d/B-ter-q7-23| 2

f. DIZ aus beiden Chromosomen 5. Beide Chromosomen sind an Bande 23 gebrochen. Die zentrischen Anteile sind fusioniert. Eines der beiden Chromosomen zeigt einen weiteren Bruch an Bande 1, der sich in einem terminalen Fragment darstellt. Ein azentrisches Fragment von Bande 23 ist fusioniert mit Bande 2 (unten rechts), während das andere mit einem DAPI-Chromosom fusioniert ist.

Kurzbeschreibung: t-dic: b-ter-pq1-22/B-int-pq22-2/b-ter-q23| 3 | 5.1/5.2
frag: b-ter-p1| s.o.
frag(f): b-ter-q23/d| s.o.

g. Falschfarbendarstellung zum Vergleich mit Darstellungen der einzelnen Fluorochrome und deren Emmissionsspektrum (FITC=grüne Linie, Cy5=gelbe Linie, TR=violette Linie, SpO=rote Linie, DEAC=blaue Linie). Insertion eines azentrischen DAPI-Fragments zwischen Bande 5 und 6. Bande 23 ist gebrochen und der proximale Anteil mit einem azentrischen DAPI-Fragment fusioniert. Das telomerhaltige Fragment von Bande 23 wurde nicht gefunden.

Kurzbeschreibung: t-ins: b-ter-p1-6/d/B-int-q7-23/d| 2

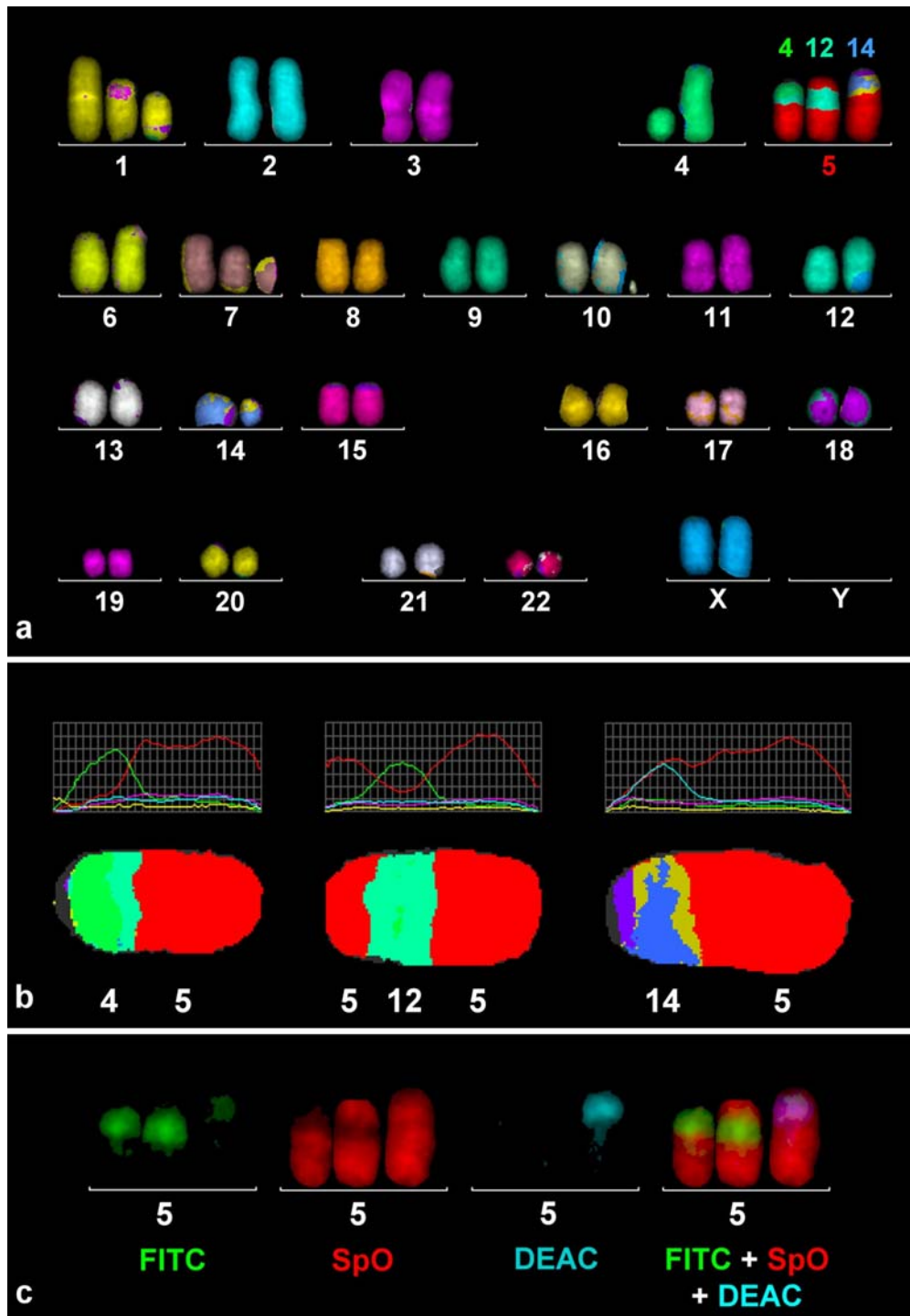


Abb. 13: CA in mFISH nach Bestrahlung mit 1 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n).

a. Karyogramm in mFISH als Falschfarben-Darstellung. Aberrationen, die nicht Chromosom 5 betreffen, sind nicht markiert. Chromosom 4 und 14 sind jeweils an ein Fragment von Chromosom 5 terminal transloziert. Chromosom 12 ist zwischen 2 Fragmenten von Chromosom 5 inseriert. Die Zuordnung der Fragmente von Chromosom 5 untereinander ist nicht möglich. Statt einer einfachen Insertion könnte auch eine komplexe Translokation zwischen 3 Chromosomen vorliegen.

b. Emissionsspektren der aberranten Chromosomen 5 im Vergleich zu deren Falschfarben-Darstellung. (FITC=grüne Linie, SpO=rote Linie, DEAC=blaue Linie).

c. Darstellung von Chromosom 5 in den einzelnen Fluorochromfarben sowie deren Kombination.

In Abb. 14 werden Beispiele aberranter Chromosomen gezeigt, die mit einer Pan-Zentromer-Sonde hybridisiert wurden. Zentromere, die in der DAPI-Ansicht nicht oder kaum sichtbar sind, können mit dieser Methode erkannt werden.

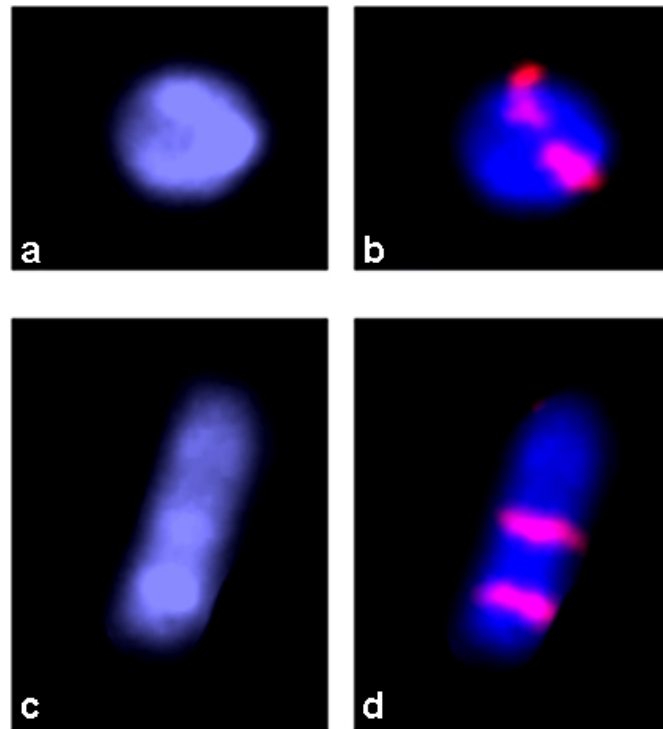


Abb. 14: CA in Pan-Zentromer-Färbung nach Bestrahlung mit 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n). DAPI-Ansicht (a,c), Pan-Zentromer-Färbung (b,d), DIZ-Ring (a,b), DIZ (c,d).

3.4 Relative Bandenlängen von Chromosom 5 in mBAND

In Abb. 15 werden die verschiedenen Bandenlängen für Chromosom 5 dargestellt.

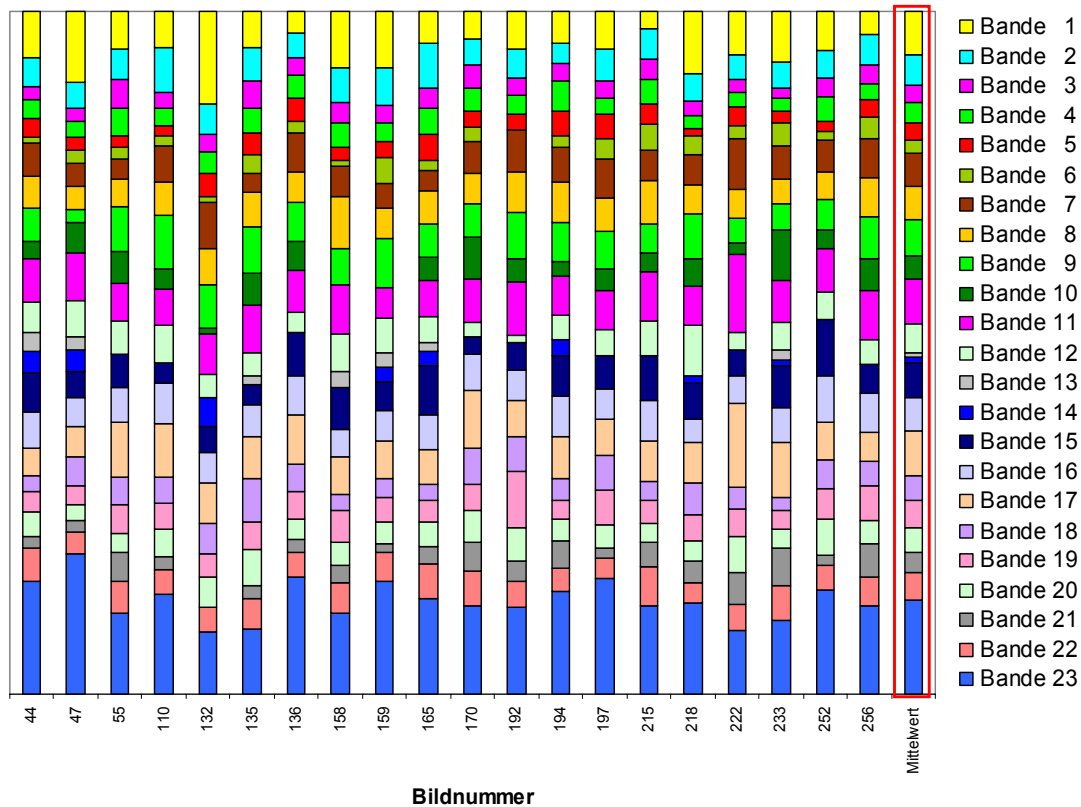


Abb. 15: Prozentuale Bandenlängen von Chromosom 5 in mBAND.

Bande	Anteil in %	Bande	Anteil in %	Bande	Anteil in %
1	6,27 ± 2,63	9	5,44 ± 1,44	17	6,33 ± 1,90
2	4,42 ± 0,93	10	3,30 ± 1,89	18	3,78 ± 1,14
3	2,69 ± 0,68	11	6,50 ± 1,46	19	4,03 ± 1,23
4	2,98 ± 0,74	12	4,08 ± 1,39	20	3,70 ± 0,98
5	2,53 ± 0,78	13	0,66 ± 0,97	21	2,77 ± 1,44
6	2,06 ± 1,07	14	0,95 ± 1,37	22	4,12 ± 0,81
7	4,78 ± 1,27	15	4,98 ± 1,55	23	13,70 ± 2,98
8	4,90 ± 1,01	16	5,02 ± 0,83		

Tab. 11: Prozentuale Bandenlängen von Chromosom 5 in mBAND einschließlich ihrer Standardabweichung. Die Werte sind aus 20 Messungen gemittelt.

Aus der Vermessung der Banden von zwanzig ungeschädigten Chromosomen ist der jeweilige Mittelwert gebildet und ein „Mittelwert-Chromosom“ erstellt worden, das als Grundlage für weitere Berechnungen, beispielsweise zur Längenbestimmung für interstitielle Fragmente, diente (Abb. 15). Zwischen einer Bandenlänge von 6,50% und der besonders langen terminalen Bande 23 mit einer Länge von 13,7% gibt es keine Längenangaben (Tab. 11). Kurze Banden entsprechen meist 3-4% des Chromosoms, lange Banden etwa 5-6%. Einige Banden, wie etwa Bande 13 und 14, waren sehr kurz oder gar nicht zu sehen. Entsprechend klein ist daher auch deren Mittelwert, der weniger als 1% beträgt. Bande 7 mit einer Länge von 4,78% entspricht dem Bereich der Zentromerregion (Abb. 15).

3.5 Bruchhäufigkeiten in Chromosom 5

Die berechneten Brüche in Chromosom 5 werden in Abb. 16 nach den Längen der Banden den zu erwartenden Brüchen gegenübergestellt.

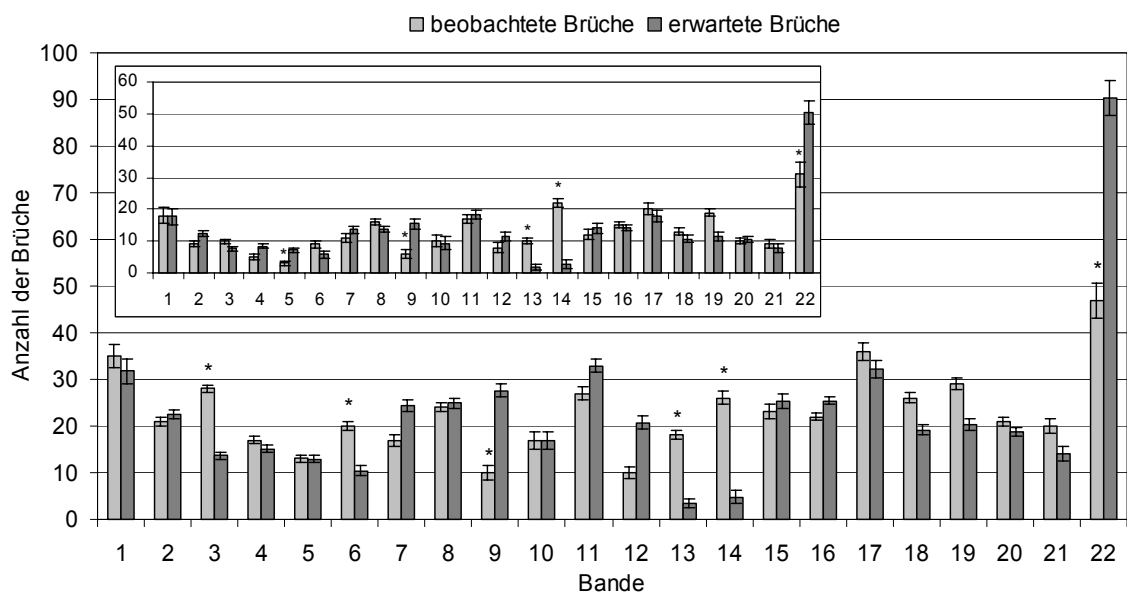


Abb. 16: Bruchverteilung pro Bande bezogen auf die jeweilige Bandenlänge. Zusammenfassung der Werte für Bestrahlungen mit 0,5 Gy, 0,75 Gy, 1 Gy, 3 Gy und 4 Gy. Bande 22 und 23 sind in 22 zusammengefasst. Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes, * = Signifikanz ($p < 0,01$). Erwartete Brüche wurden anhand aller Brüche, bezogen auf die jeweilige Bandenlänge, berechnet. Der Diagramm-Einschub zeigt Vergleichsdaten für 4 Gy.

Die Anzahl der Brüche in p-Arm (Bande 1-7) und q-Arm (Bande 8-22) entsprach nach χ^2 -Test deren Längenverhältnis. Signifikanzen waren hinsichtlich der relativen Bandenlänge zwischen den Banden 3 (signifikant mehr), Bande 6 (signifikant mehr),

Bande 9 (signifikant weniger), Bande 13-14 (signifikant mehr) und Bande 22[+23] (signifikant weniger) zu finden. Unter der Annahme, die kurzen Banden 13 und 14 könnten das Ergebnis verzerren, wurden diese Banden versuchsweise für eine Berechnung zusammengefasst. Aber auch in diesem Fall ergaben sich signifikant mehr Brüche. Die geringe Anzahl der beobachteten Brüche in Bande 12 wäre erst für $p < 0,05$ signifikant (Abb. 16). Der Diagramm-Einschub in Abb. 16 für eine Dosis von 4 Gy zeigt ähnliche Verteilungen wie für die zusammengefassten Daten.

3.6 Die Länge interstitieller Fragmente

In Abb. 17, 18 und 19 werden die interstitiellen Fragmente gemäß ihrer relativen Länge dargestellt. Die Daten in Abb. 17 werden in den anschließenden Abb. 18 und 19 weiter aufgeschlüsselt.

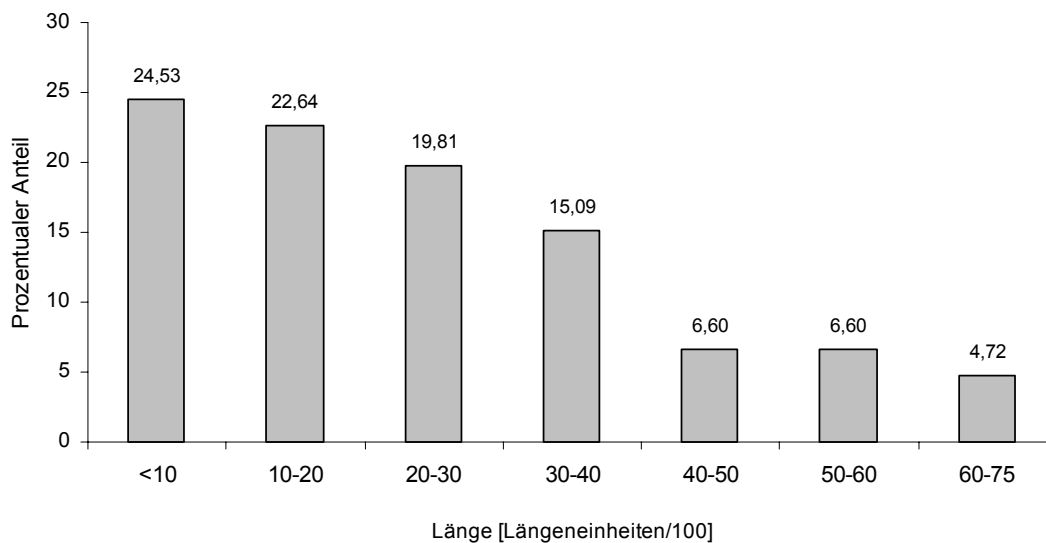


Abb. 17: Relative Länge interstitieller Fragmente, die an CA beteiligt waren, nach Bestrahlung mit 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n).

Etwa 25% von 106 gefundenen interstitiellen Fragmenten, die an CA beteiligt waren, hatten eine relative Länge <10 der Gesamtschromosomenlänge von 100. Innerhalb dieser Gruppe hatten wiederum etwa 37% eine Länge ≤ 5 (nicht dargestellt). Etwa 67% der interstitiellen Segmente hatten eine Länge ≤ 30 . Größere Segmente (>30) wurden deutlich seltener gefunden: Länge 30-40 etwa 15%, Länge 40-60 6,6%. Nur etwa 5% der Segmente hatten eine relative Länge ≥ 60 , die fast der Länge des gesamten q-Arms entspricht. Interstitielle Segmente mit mehr als 75 Längeneinheiten wurden nicht gefunden (Abb. 17).

Abb. 18 zeigt die Längenverteilungen von Fragmenten in Translokationen.

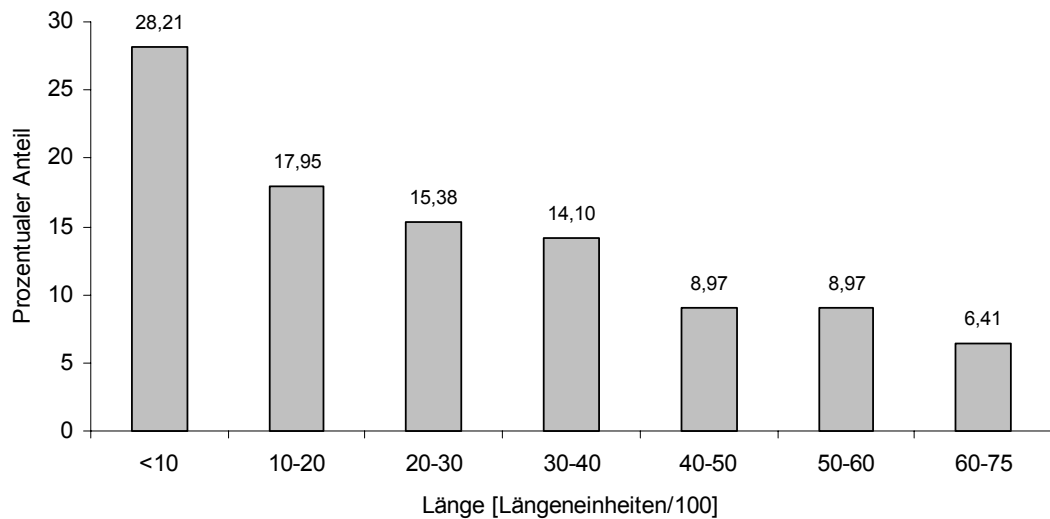


Abb. 18: Relative Länge azentrischer interstitieller Fragmente, die an Translokationen beteiligt waren, nach Bestrahlung mit 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n).

Fragmente aller Längen waren an Translokationen beteiligt. Die meisten Fragmente (etwa 75%) hatten Längen bis 40, etwa 25% waren länger als 40 (Abb. 18). Die Längenverteilung für Deletionen wird in Abb. 19 gezeigt.

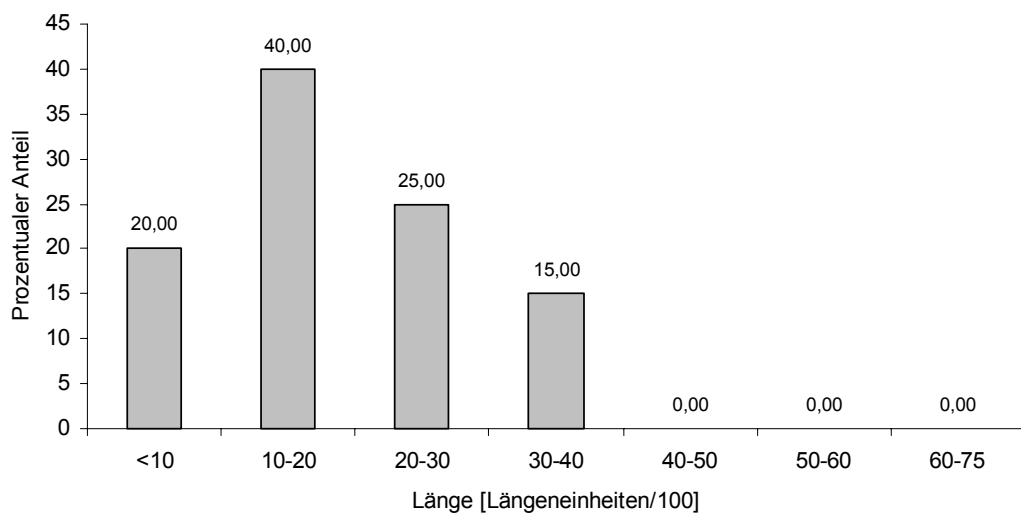


Abb. 19: Relative Länge azentrischer interstitieller Fragmente, die an Deletionen beteiligt waren, nach Bestrahlung mit 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n).

Die Längen der Fragmente aus interstitiellen Deletionen lagen alle bei ≤ 40 , längere Fragmente waren nicht als Deletionen vorhanden. Dieser Unterschied ist im Vergleich zu Abb. 18 signifikant. Der größte Anteil (40%) lag zwischen 10 und 20 (Abb. 19).

3.7 Lokalisation interstitieller Fragmente in Chromosom 5

In Abb. 20 wird für mBAND schematisch dargestellt, welche Bandenbereiche die gefundenen interstitiellen Fragmente von Chromosom 5 nach 4 Gy Fe-Ionen umfassen.

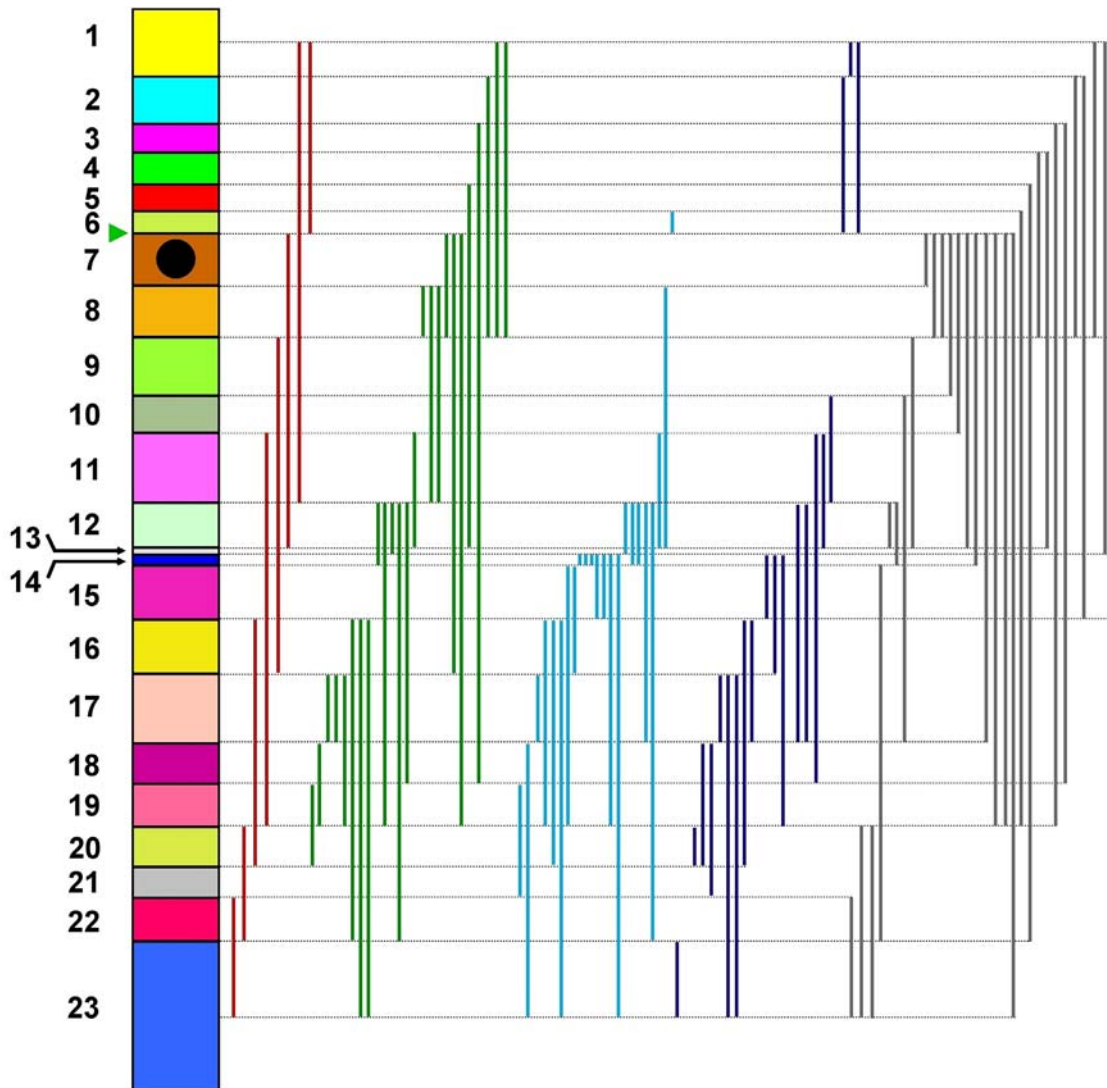


Abb. 20: Lokalisationsschema für interstitielle Fragmente in Chromosom 5 (mBAND), bezogen auf Inversionen, Insertionen, acentrische Fragmente und zentrische Translokationen. Die Bandenlängen entsprechen denen des Mittelwert-Chromosoms aus Abb. 15. Markierungslinien geben den Bandenbereich der Fragmente am Chromosom an. Bestrahlung mit 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n). Der schwarze Punkt in Bande 7 kennzeichnet die Zentromerregion. Gefunden wurden: 8 Inversionen (rote Linien), 25 Insertionen von Chromosom 5 zwischen DAPI-Fragmenten (grüne Linien), 23 fusionierte acentrische interstitielle Fragmente (hellblaue Linien), 20 frei liegende acentrische interstitielle Fragmente (dunkelblaue Linien), 30 interstitielle Fragmente, die ein Zentromer enthalten oder zu einem zentrischen Fragment transloziert sind (graue Linien), 2 Insertionen von DAPI-Fragmenten in Chromosom 5 (grüne Pfeilspitze).

Die Länge der interstitiellen Fragmente aus Abb. 20 beträgt im Durchschnitt 15% der Gesamtlänge von Chromosom 5. Es wurden zwei perizentrische und sechs parazentrische Inversionen gefunden, die über das gesamte Chromosom verteilt sind (rote Linien in Abb. 20). Fragmente, die an Insertionen zwischen zwei DAPI-Fragmenten beteiligt sind, verteilen sich über das gesamte Chromosom. Ob es sich bei diesem Insertionstyp um zwei Translokationen handelt, lässt sich mit mBAND nicht nachweisen. Nur zwei Insertionen von DAPI-Fragmenten wurden zwischen Bande 6 und 7 gefunden (grüne Pfeilspitze in Abb. 20). Interstitielle Abschnitte, die als fusionierte (hellblaue Linien in Abb. 20) oder freie Fragmente (dunkelblaue Linien in Abb. 20) erscheinen, treten im q-Arm gehäuft auf. Zwischen Bande 7 (Zentromerregion) und Bande 12 wurden vergleichsweise wenige Fragmente gefunden. Meistens waren sie zwischen Bande 12 und 22 zu finden. Fusionierte und freie Fragmente traten etwa im Verhältnis 1:1 auf (23 fusionierte- und 20 freie Fragmente). Das Verhältnis zwischen Fragmenten, die auf interstitiellen Segmenten basieren und den interstitiellen Abschnitten, die an zentrische DAPI-Chromosomen transloziert oder selber zentrisch sind, beträgt etwa 0,7:1. Unter Einbeziehung der terminalen Fragmente liegt das Verhältnis bei 1:1. Größere oder kleinere terminale Deletionen an beiden Telomeren hinterlassen recht große zentrische Fragmente, welche in Translokationen (graue Linien) verwickelt waren. Etwa die Hälfte der zentrischen Fragmente waren zwischen Bande 6 und 7 oder Bande 8 und 9, also deutlich in Nähe des Zentromers, gebrochen.

Die mittlere Länge der interstitiellen Fragmente ist meist länger als der p-Arm, was dazu führt, dass es nur wenige interstitielle Fragmente aus dem p-Arm gibt. Fragmente mit dieser Länge verteilen sich über das gesamte Chromosom.

3.8 CA nach Bestrahlung mit Fe-Ionen mit 200 MeV/n und 500 MeV/n

In den Abb. 21 und 22 wird eine Analyse der Anzahl von Bruchereignissen in Chromosom 5 vorgenommen und mit verschiedenen Strahlen- und Energiedosen verglichen.

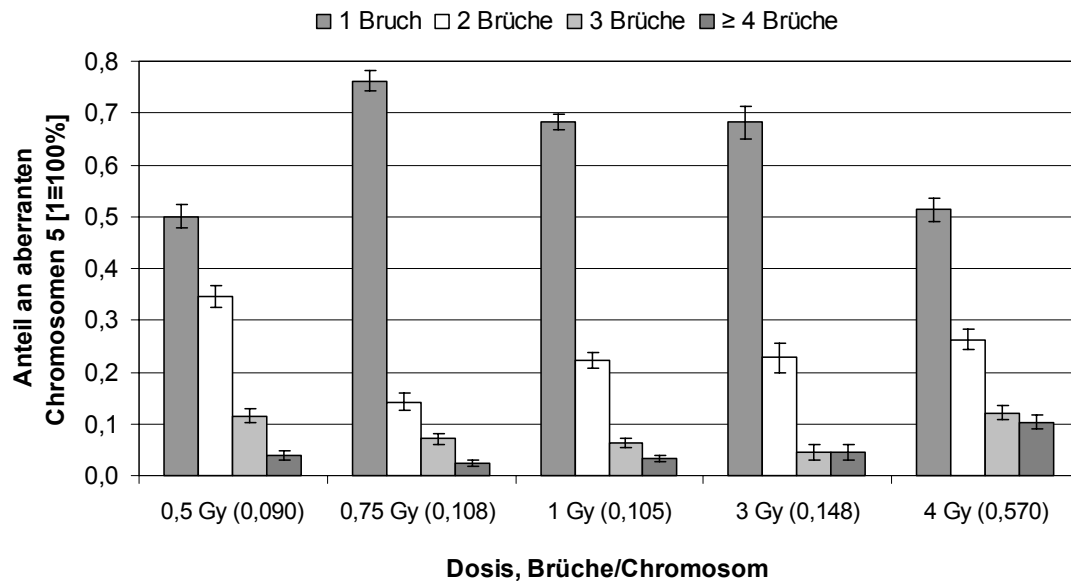


Abb. 21: Anzahl der Bruchereignisse in aberranten Chromosomen 5 nach Bestrahlungen mit 0,5 Gy, 0,75 Gy, 1 Gy, 3 Gy und 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n). Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes.

Die Bruchverteilung in Abb. 21 ist innerhalb des Chromosoms bei 0,5 Gy und 4 Gy ähnlich, ebenso wie bei 0,75 Gy bis 3 Gy. Allerdings liegen bei 1 Gy die Einzelbruchereignisse mit etwa 0,68 über denen von 0,75 Gy (0,56) und 3 Gy (0,46). Entsprechend variabel ist auch das Verhältnis von „Einzelbruch“ zu „Summe der Mehrfachbrüche“. Bei 0,5 Gy ist das Verhältnis 1:1, bei 0,75 Gy 1:3,2, bei 1 Gy 1:1,5, bei 3 Gy 1:1,4 und bei 4 Gy 1:1,05. Bei Zusammenfassung der Daten für alle Dosen liegt der Quotient von „Einzelbruch“ und „Summe aller Mehrfachbrüche“ bei 1,45. Es gibt demnach mehr Einzelbruchereignisse als Mehrfachbrüche.

Fasst man die Ein- und Zwei-Bruchereignisse sowie die Drei- und Vier- und mehr-Bruchereignisse aller Daten zusammen und bildet daraus den Quotienten, dann erhält man fünfmal mehr Ein-/Zwei-Bruchereignisse als Drei-/Vier- und mehr-Bruchereignisse am Chromosom.

Für eine Unterscheidung zwischen den Bruchverteilungen bei verschiedenen Energien sind Ergebnisse in Abb. 22 zusammengestellt.

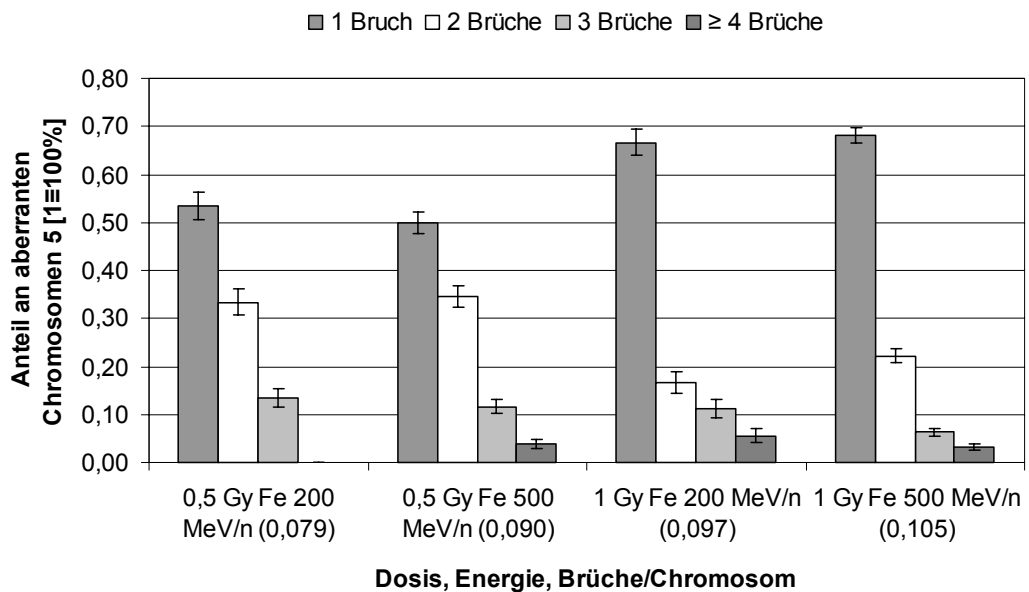


Abb. 22: Vergleich der Bruchverteilung in aberranten Chromosomen 5 nach Bestrahlung mit 0,5 Gy und 1 Gy Fe-Ionen (200 MeV/n und 500 MeV/n). Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes.

Insgesamt zeigt die Verteilung der Brüche in Abb. 22 für die verschiedenen Energien etwa gleiche Werte. Strahlendosen von 0,5 Gy und 1 Gy erzeugen pro Dosis bei verschiedenen Energien etwa die gleiche Zahl an Einzelbrüchen. Für die Berechnung der Quotienten aus „Einzelbruch/Summe aller Mehrfachbrüche“ liegen die Werte für 200 MeV/n bei 1,53, bei 500 MeV/n bei 1,69. Damit ergibt sich für 200 MeV/n und 500 MeV/n ein nahezu gleiches Verhältnis von 1:1,1. Werden auch hier die Ein- und Zwei-Bruchereignisse pro Chromosom 5 zusammengefasst und den Drei- und Vier-und-mehr-Bruchereignissen gegenübergestellt, dann berechnen sich Werte für 200 MeV/n von 5,60 und für 500 MeV/n von 7,90. Damit ergibt sich für 200 MeV/n und 500 MeV/n ein Verhältnis von 1:1,4. Die Bruchverteilung ist demnach für beide Energien ähnlich.

Für alle Dosen, ausgenommen 1 Gy 200MeV/n, ist die Zahl der Brüche überdispersiert (Tab. 12). Für 200 MeV/n ist für den Dispersionsindex von 1,09 eine Poisson-Verteilung festgestellt werden. Bei 0,5 Gy und 4 Gy liegt der Dispersionsindex (σ^2/Y , wobei σ^2 der Varianz entspricht und Y dem Mittelwert) etwa bei 2 und für 0,75 Gy, 1 Gy und 3 Gy bei etwa 1,7.

Behandlung	Untersuchte Zellen	Prozentualer Anteil von Zellen mit aberranten Chromosomen	Anzahl aberranter Chromosomen	Brüche pro Chromosom	Dispersion s Index
mBAND-Analyse für 500 MeV/n					
0,5 Gy	244	10,25	26	0,090	2,00 *
0,75 Gy	262	13,98	42	0,108	1,63 *
1 Gy	432	12,73	63	0,110	1,73 *
3 Gy	108	16,67	22	0,148	1,73 *
4 Gy	248	47,98	156	0,570	1,80 *
mBAND-Analyse für 200 MeV/n					
0,5 Gy	151	8,61	15	0,079	1,26 *
1 Gy	144	11,11	18	0,097	1,09
mFISH-Analyse für 500 MeV/n					
1 Gy	183	15,85	31	-	-
4 Gy	128	43,75	75	-	-

Tab. 12: Dispersionsindex und Brüche in aberranten Chromosomen 5 nach Bestrahlung mit Fe-Ionen (200 MeV/n und 500 MeV/n). Die mBAND- und mFISH-Analyse wurden im gleichen Experiment durchgeführt. * = signifikant überdispersiert mit $p < 0,05$.

Für die verschiedenen Energien bei Fe-Ionen ist in Abb. 23 ein Vergleich zwischen aberranten Zellen, Fragmente und Translokationen dargestellt.

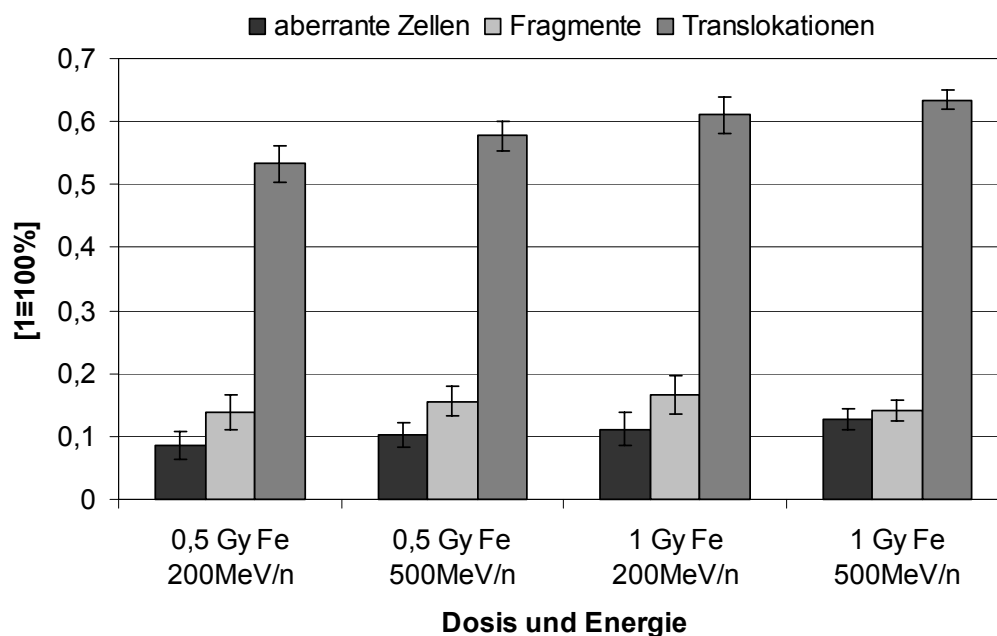


Abb. 23: Vergleich von aberranten Zellen, Fragmenten und Translokationen in mBAND nach Bestrahlung mit 0,5 Gy und 1 Gy Fe-Ionen (200 MeV/n und 500 MeV/n). Der Anteil von Zellen mit aberranten Chromosomen 5 sowie die Fragmente sind bezogen auf alle untersuchten Zellen. Fragmente umfassen alle Chromosomenabschnitte ohne Zentromer und Fusionsfragmente unter Beteiligung von Chromosom 5. Translokationen sind bezogen auf aberrante Chromosomen 5 und enthalten auch die fusionierten Fragmente. Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes.

Die Zahl aberranter Zellen in Abb. 23 liegt für 0,5 Gy bei steigender Energie zwischen 8,6% und 10,3% und für 1 Gy zwischen 11,1% und 12,7%. Fragmente wurden über alle Dosen und Energien von 13,9% bis 16,7% gefunden. Für 500 MeV/n liegt der Wert bei 14,2% und ist somit niedriger als bei 200 MeV/n. Die Gesamtzahl aller Translokationen unter Beteiligung von Chromosom 5 erhöht sich pro Dosis und Energie und umfasst Werte von etwa 53,3% und 63,5%. Die Häufigkeit der Translokationen steigt geringfügig mit höherer Energie und deutlicher bei einer höheren Dosis. Insgesamt betrachtet sind die Unterschiede der Strahleneffekte für verschiedene Energien nicht signifikant.

3.9 Vergleiche aberranter Chromosomen mit aberranten Zellen

Abb. 24 zeigt eine Dosis-Effekt Beziehung nach Bestrahlung mit schweren Ionen für aberrante Chromosomen und aberrante Zellen.

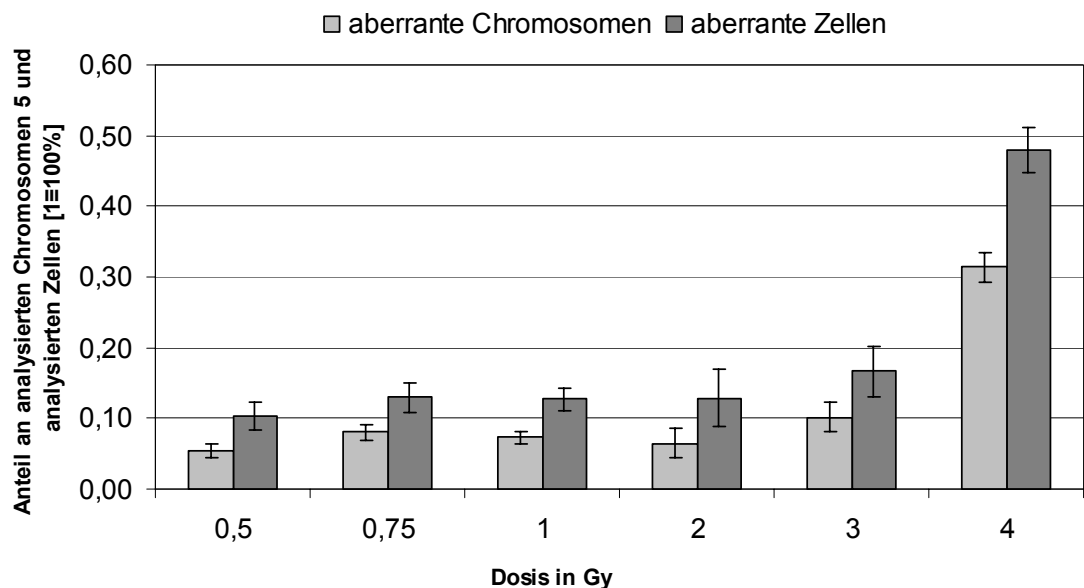


Abb. 24: Vergleich von aberranten Chromosomen 5 und aberranten Zellen nach Bestrahlungen mit 0,5 Gy, 0,75 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n), bezogen auf alle analysierten Chromosomen 5 und auf alle untersuchten Zellen. Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes.

Erwartungsgemäß erhöht sich die Anzahl aberranter Zellen und aberranter Chromosomen mit steigender Dosis (Abb. 24). Bei 4 Gy ist fast die Hälfte aller untersuchten Zellen hinsichtlich des Chromosoms 5 geschädigt. Setzt man alle aberranten Zellen ins Verhältnis zu allen untersuchten Zellen für alle Dosen, dann ergibt

sich ein Wert von 1:5,25, was einer Schädigung von etwa 20% der untersuchten Zellen entspricht. Das Verhältnis von aberranten Zellen zu aberranten Chromosomen 5 beträgt 1:1,2, es ist somit mehr als ein Chromosom 5 pro Zelle geschädigt. Für die einzelnen Bestrahlungsdosen ist diese Situation erkennbar, wenn die Zahl aberranter Chromosomen 5 über die Hälfte des ermittelten Wertes für aberrante Zellen ansteigt. Bei Strahlendosen von 3 Gy und 4 Gy liegen diese Werte etwa bei 75% und sind besonders deutlich (Abb. 24).

3.10 Vergleich mBAND, mFISH, Pan-Zentromer-Färbung

Ergebnisse zur Überprüfung von mBAND, mFISH und der Pan-Zentromer-Färbung sind in den Abb. 25, 26 und 27 dargestellt.

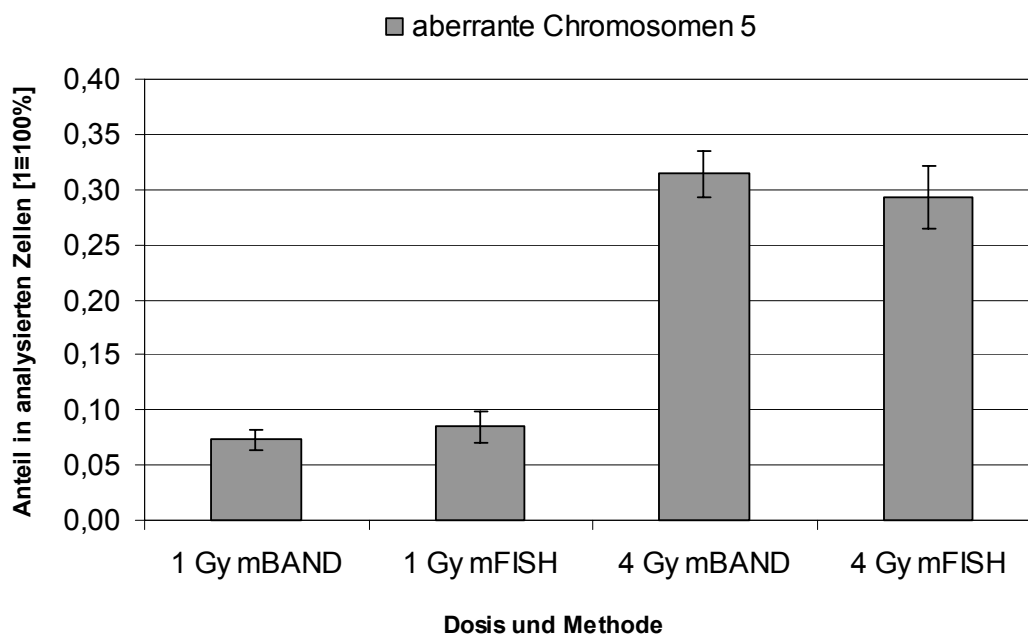


Abb. 25: Anteil aberranter Chromosomen 5 in mBAND und mFISH, bezogen auf alle untersuchten Zellen, nach Bestrahlung mit 1 Gy und 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n). Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes.

Ein Vergleich der Methoden mBAND und mFISH zeigt, dass die Anzahl aberranter Chromosomen bei der Auswertung keine signifikanten Unterschiede zeigt (Abb. 25).

Einfache Interchange und komplexe Interchange in mBAND und mFISH werden in Abb. 26 dargestellt.

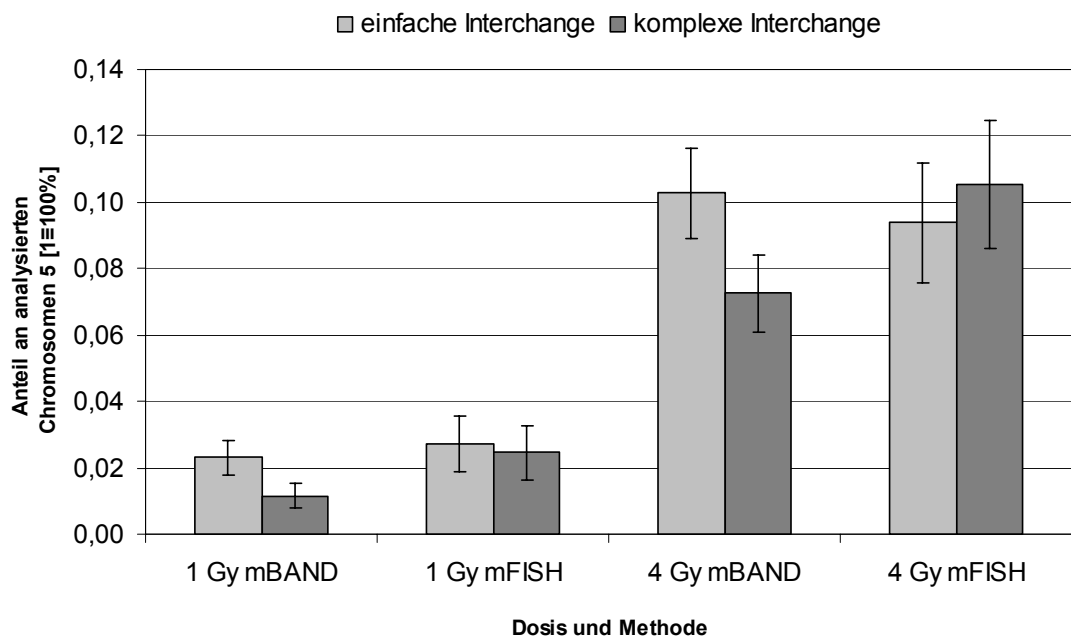


Abb. 26: Methodenvergleich mBAND/mFISH für einfache/komplexe Interchange nach Bestrahlung mit Fe-Ionen (500 MeV/n), bezogen auf alle Chromosomen 5. Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes.

Die Anzahl der Interchange ist pro Dosis für mBAND und mFISH nicht signifikant verschieden (Abb. 26). Für einfache Interchange nach 1 Gy Fe-Ionen liegen die Werte für mBAND bei 0,023 und für mFISH bei 0,027, für komplexe Interchange bei 0,01 und 0,02. Bei einer Dosis von 4 Gy ergeben sich für mBAND Werte von 0,1 und für mFISH von 0,09 für einfache Interchange und 0,07 und 0,10 für komplexe Interchange.

Der Anteil DIZ wurde mit mBAND und Pan-Zentromer-Färbung erfasst und die Ergebnisse in Abb. 27 gegenübergestellt.

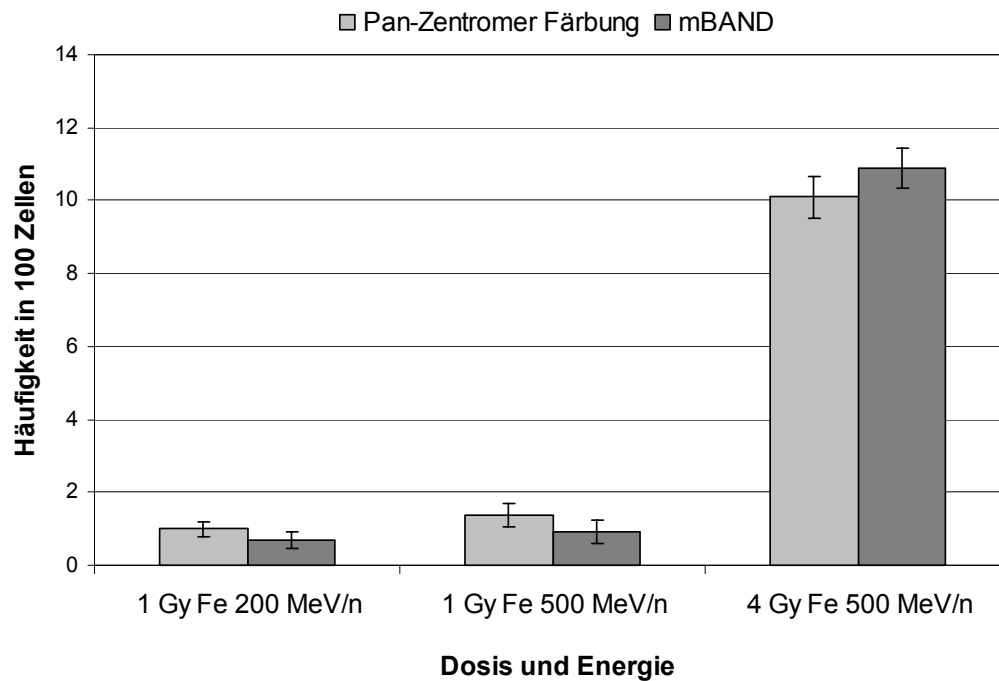


Abb. 27: DIZ von Chromosom 5 untersucht mit Pan-Zentromer-Färbung und mBAND. Die Häufigkeit der Chromosomen 5, in der Pan-Zentromer-Färbung wurde aus der Anzahl DIZ aller Chromosomen berechnet und den ausgezählten DIZ aus mBAND-Präparaten gegenübergestellt. Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes.

Die Anzahl der DIZ mit Chromosom 5 wurden für die Pan-Zentromer-Färbung berechnet nach LUCAS *et al.* (1992). Die Formel basiert auf der Annahme, dass die Verteilung der Interchange proportional zum DNA Gehalt der Chromosomen ist. Diese Hypothese wird häufig diskutiert und ist zusammengefasst bei JOHNSON *et al.* (1999).

$$F_G = \frac{F_5}{2,05[f_5(1 - f_5)]}$$

F_G ist die Häufigkeit der DIZ im Genom. F_5 ist die Anzahl der DIZ, an denen Chromosom 5 beteiligt ist. f_5 ist der Anteil von Chromosom 5 am gesamten Genom der Zelle (Mittelwert des Anteils: 0,0605 nach MORTON, 1991). Im Vergleich gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Methoden. Obwohl es mit mBAND zum Teil schwierig war, das Zentromer der nicht gebänderten PCC Chromosomen zu erkennen, war die Auswertung im Mittel korrekt (Abb. 27).

Bei 1 Gy liegt die Zahl der DIZ 5 bei etwa 1-1,5 in 100 Zellen, unabhängig von der verwendeten Energie. Bei 4 Gy sind es etwa 10-11 DIZ auf 100 Zellen, etwa 5,5mal mehr als bei 1 Gy.

3.11 Vergleiche von Interchangen und Intrachangen

Damit die Höhe der Schädigung und die Komplexität der CA stärker herausgestellt werden kann, werden in den Abb. 28-31 Ergebnisse zu Interchangen, Intrachangen, terminalen Deletionen und einige ihrer Quotienten zueinander in Beziehung gesetzt.

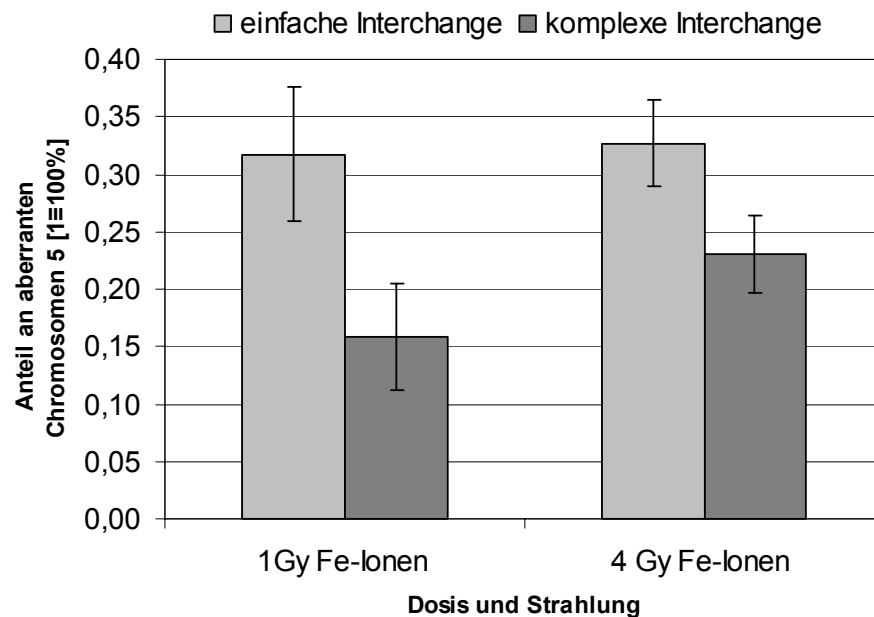


Abb. 28: Einfache und komplexe Interchange mit Beteiligung von Chromosom 5 nach Bestrahlung mit 1 Gy und 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n), bezogen auf aberrante Chromosomen 5. Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes.

Bei 1 und 4 Gy ist in Abb. 28 der Anteil einfacher Interchange mit 0,32 und 0,33 etwa gleich. Bei 1 Gy beträgt die Zahl der komplexen Interchange etwa 0,16. Somit treten doppelt so viele einfache Interchange wie komplexe Interchange auf. Auch bei 4 Gy überwiegt der Anteil der einfachen Interchange um etwa ein Drittel.

Damit Angaben über die Dichte der Ionisation gemacht werden können, werden intra-arm und inter-arm Intrachange in Abb. 29 bei zwei verschiedenen Dosen miteinander verglichen.

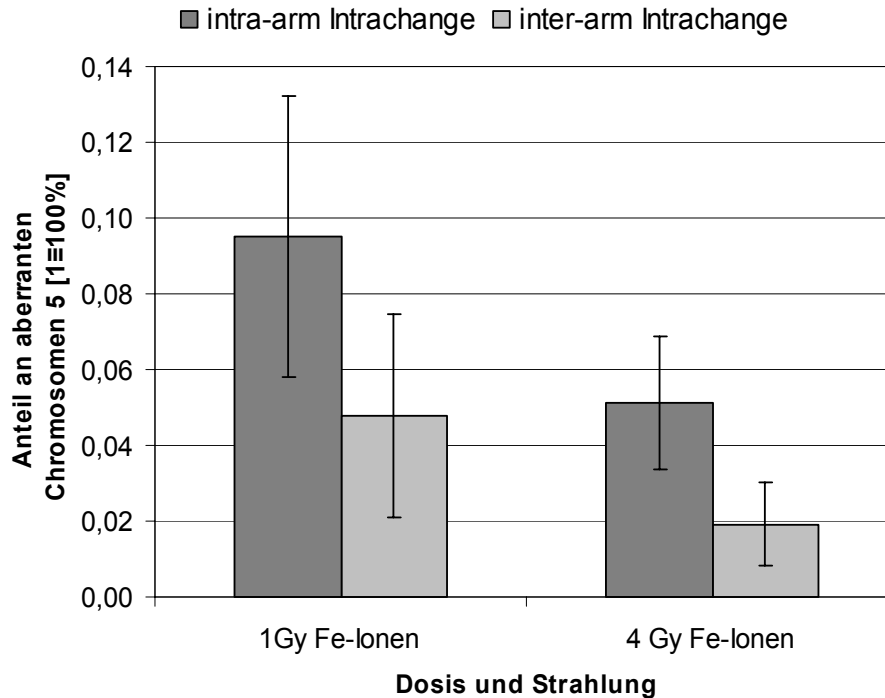


Abb. 29: Intra-arm Intrachange und inter-arm Intrachange in Chromosom 5 nach Bestrahlung mit 1 Gy und 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n), bezogen auf aberrante Chromosomen 5. Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes.

Bei einer Dosis von 1 Gy wurden doppelt so viele intra-arm Intrachange gefunden wie inter-arm Intrachange. Dies hat zur Folge, dass parazentrische Inversionen entsprechend häufiger sind als perizentrische. Für 4 Gy ist zwar das Verhältnis von intra-arm zu inter-arm Intrachangen ähnlich wie bei 1 Gy, allerdings sind hier die ermittelten Werte nur etwa halb so groß (Abb. 29).

Zur Veranschaulichung der Schäden in Chromosom 5 werden in Abb. 30 terminale Deletionen und CA, die nur Intrachange oder Interchange enthalten, mit CA verglichen, in denen Intra- und Interchange gleichzeitig festgestellt wurden.

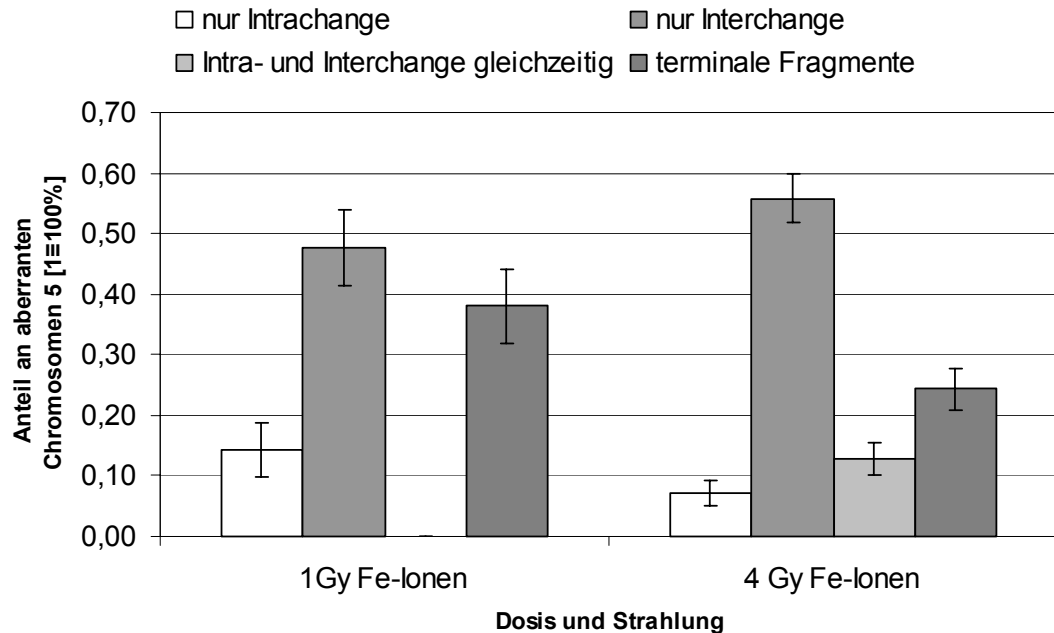


Abb. 30: Intra- und Interchange sowie terminale Fragmente bei Bestrahlungen von 1 Gy und 4 Gy mit Fe-Ionen (500 MeV/n), bezogen auf aberrante Chromosomen 5. Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes.

Die Zahlen der Interchange sind bei 1 Gy und 4 Gy höher als die der Intrachange (Abb. 30): bei 1 Gy etwa um das 3,5fache, bei 4 Gy um das 8fache. Terminale Fragmente sind bei 1 Gy 1,6mal häufiger als bei 4 Gy. Allerdings gibt es bei 4 Gy zu einem Anteil von 0,13 Intra- und Interchange gleichzeitig in Chromosom 5, während bei 1 Gy gleichzeitige Ereignisse nicht gefunden wurden.

Für die Aberrationsdaten aus den mBAND-Experimenten wurden Quotienten wie folgt berechnet:

1. komplexe/einfache Interchange (C-Quotient)
2. intra-arm/inter-arm Intrachange (G-Quotient)
3. einfache Interchange/Intrachange (F-Quotient)

Diese Quotienten können dazu dienen festzustellen, ob nach Bestrahlung mit schweren Ionen bestimmte CA gehäuft auftreten („Fingerabdruck“). Die Daten sind in Abb. 31 zusammengestellt.

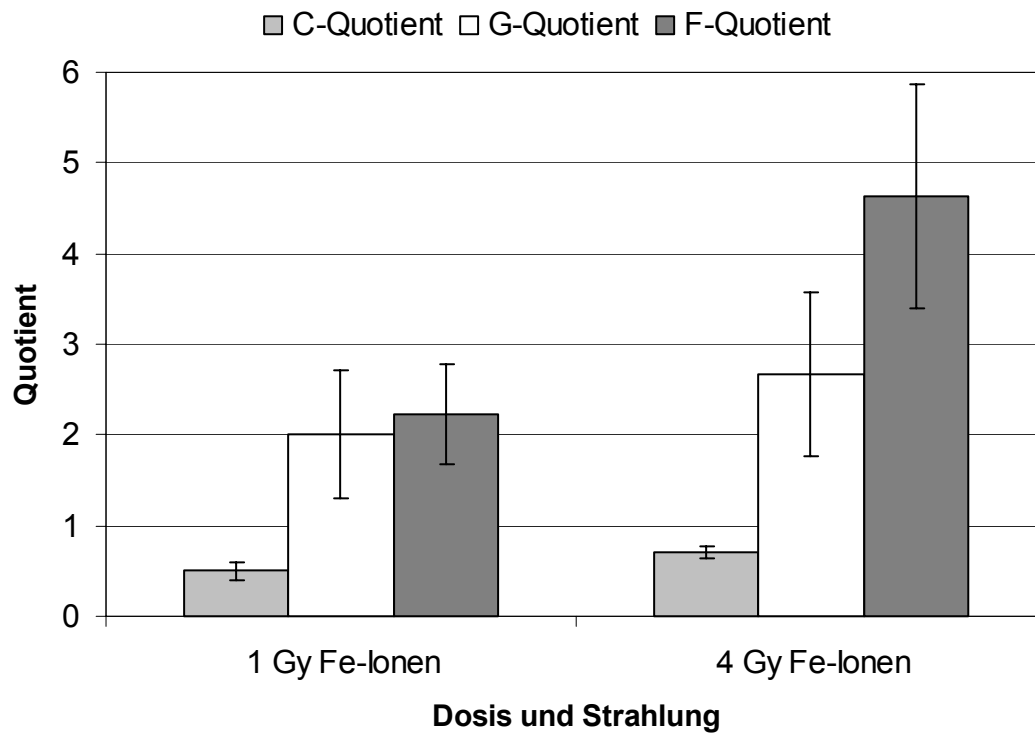


Abb. 31: Quotientenvergleich von komplexen zu einfachen Interchangen (C-Quotient), intra- zu inter-arm Intrachangen (G-Quotient) und einfachen Interchangen zu Intrachangen (F-Quotient) für Chromosom 5 nach Bestrahlung mit 1 Gy und 4 Gy Fe-Ionen. Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes.

Die Quotienten in Abb. 31 erhöhen sich im Dosisvergleich in der Reihenfolge C, G und F. Der C-Quotient liegt bei 1 Gy bei 0,5, bei 4 Gy bei 0,7 und wäre im Mittelwert von 0,6 ähnlich. Bei beiden Dosen überwog die Zahl einfacher Interchange gegenüber komplexen Interchangen. Der G-Quotient liegt bei 1 Gy bei 2,0, bei 4 Gy bei 2,6. Es wurden bei 4 Gy etwa 2,6mal mehr intra-arm Intrachange gefunden als inter-arm Intrachange. Der F-Quotient ist bei 1 Gy 2,2 und bei 4 Gy 4,6. Bei 4 Gy ist dieses Verhältnis mehr als doppelt so hoch wie im Vergleich zu 1 Gy. Alle Quotienten sind demnach bei einer höheren Dosis ebenfalls größer.

3.12 Verteilung von CA in PBL von Astronauten

In den Abb. 32 und 33 wird das Vorkommen von CA in PBL bei Astronauten aus einem kurzen und einem langen Flug zur Raumstation ISS angegeben.

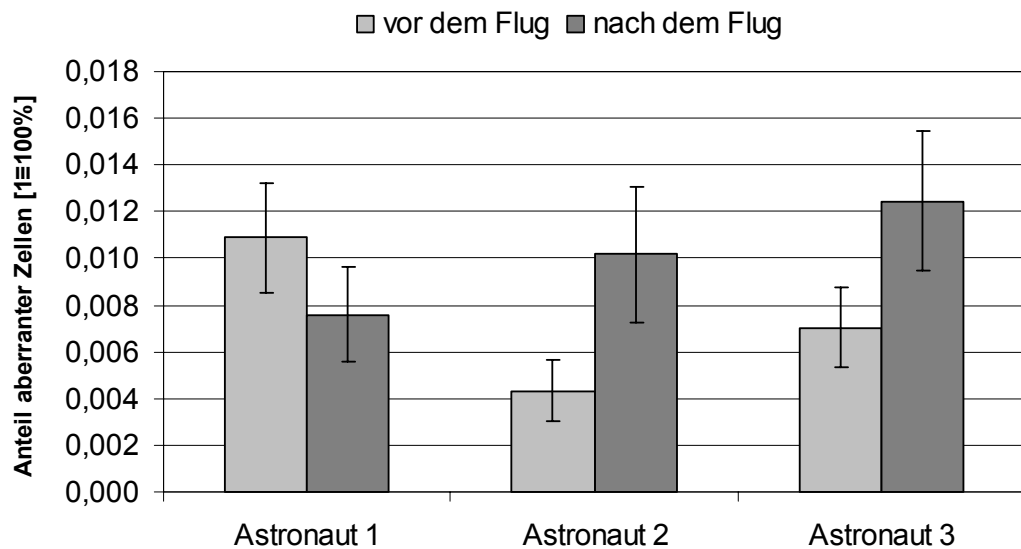


Abb. 32: Flug zur internationalen Raumstation ISS mit einer Aufenthaltsdauer von neun Tagen. Zusammengefasste Daten für aberrante Zellen aus Untersuchungen mit Giemsa-Färbung, mBAND und mFISH. Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes.

Der Vergleich von drei Astronauten, die an einem Taxiflug mit einer Dauer von neun Tagen zur Raumstation ISS teilnahmen, zeigt nur bei Astronaut 2 eine signifikante Erhöhungen in der Anzahl aberranter PBL nach dem Flug (Abb. 32). Die CA beschränkten sich meist auf Bruchereignisse (B' und B''), die überwiegend in der Giemsa-Auswertung gefunden wurden. Etwa 0,6% der untersuchten Zellen hatten diese CA. Bei Astronaut 2 wurden nach dem Flug ein, bei Astronaut 3 zwei DIZ gefunden. Intrachromosomale CA in Chromosom 5 wurden in mBAND nicht gefunden. Mit mFISH konnten keine reziproken Translokationen nachgewiesen werden, lediglich eine unvollständige Translokation zwischen Chromosom 21 und Chromosom 2 fand sich bei Astronaut 3.

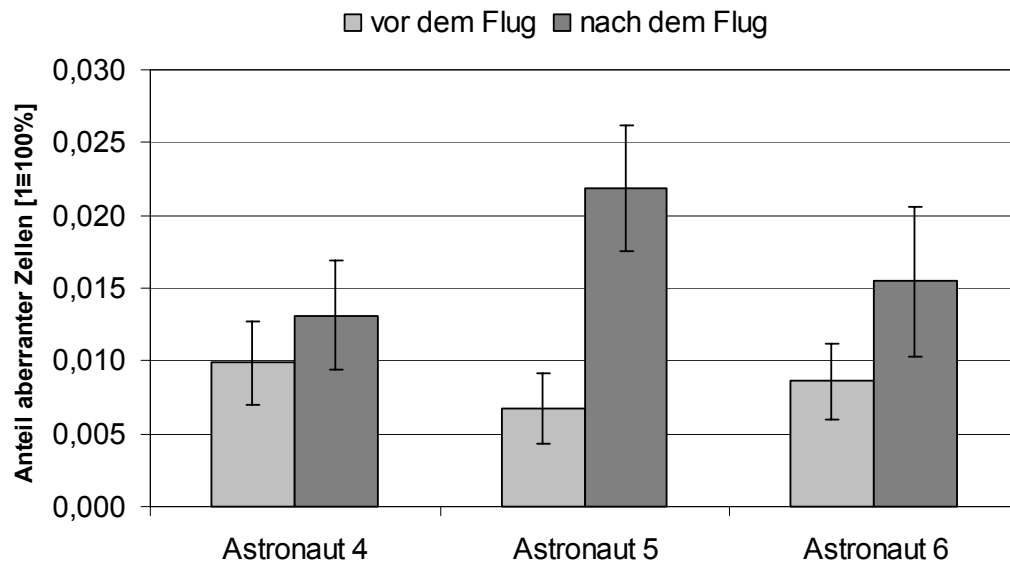


Abb. 33: Flug zur internationalen Raumstation ISS mit einer Aufenthaltsdauer von fünf Monaten. Zusammengefasste Daten für aberrante Zellen aus Untersuchungen mit Giemsa-Färbung, mBAND und mFISH. Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes.

Alle Astronauten zeigen einen Anstieg in der Zahl aberranter Zellen nach einem Langzeitaufenthalt von fünf Monaten (Abb. 33). Für Astronaut 4 und 6 sind diese Erhöhungen allerdings nicht signifikant.

Obwohl alle Astronauten fünf Monate im All verbracht haben, zeigt Astronaut 5 nach χ^2 -Test ($p < 0,01$) eine signifikante Erhöhung in der Zahl aberranter Zellen. In jeder aberranten Zelle wurde nur eine CA gefunden. Anteilig an allen untersuchten Zellen verteilten sich die aberranten Zellen und die dazugehörigen Aberrationen überwiegend auf B' und B'' (1,92%), auf Ringe (0,26%) und reziproke Translokationen (0,17%). Ferner wurde eine multi-aberrante Zelle (Rogue-Zelle) gefunden (0,08%). Außer einer interstitiellen Deletion bei Astronaut 6 waren mit mBAND keine weiteren intrachromosomalen CA an Chromosom 5 nachweisbar.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden chromosomale Untersuchungen von PBL, die mit schweren Fe-Ionen *in vitro* bestrahlt wurden, durchgeführt und mit mBAND, mFISH und Pan-Zentromer-Färbung analysiert. Die Ergebnisse werden mit *in vivo* Daten, die aus der Analyse der PBL von Astronauten der internationalen Raumstation ISS gewonnen wurden, verglichen. Für die Analyse und Protokollierung der Daten von CA wurde für mBAND ein neues Verfahren eingesetzt.

4.1 Methodik

Für die Auswertung der CA waren verschiedene Gegebenheiten der mBAND-Technik und der Analysesoftware zu berücksichtigen. Normalerweise werden bei mBAND-hybridisierten Präparaten 22-24 Banden in Chromosom 5 angezeigt. In den ersten mBAND-Untersuchungen wurde mit nur 12 Banden gearbeitet (JOHANNES, 1999). Dies ist in der Chromosomenpräparation und in der Kalibrierung der Software begründet. Hier wurde eine Kalibrierung für die Darstellung von 23 Banden verwendet, wie sie auch von METASYSTEMS empfohlen wird. Auf dieser Grundlage wurde auch das vorgestellte Klassifizierungssystem entwickelt. Die Banden basieren nicht auf strukturellen Eigenschaften des Chromosoms, wie beispielsweise bei den Giemsa Banden in ISCN (ISCN, 1995), sondern orientieren sich an den entsprechend positionierten DNA-Sonden.

Teilweise ergaben sich technische Probleme bei der Analyse der FISH Präparate, die kurz erläutert werden. Wenn in mBAND bei einem ungeschädigten Chromosom die terminalen Banden 1 und 23 unzureichend oder gar nicht dargestellt werden konnten, bedeutete das nicht, dass die zugehörigen Chromosomenteile fehlten. Eine Ansicht der Fluorochrom-Einzelfarben gab in der Regel Auskunft über den Verbleib bestimmter Chromosomenabschnitte.

Schwieriger war die Analyse telomerloser äußerer Banden eines Fragments. Es kam vor, dass die Bande plötzlich nicht mehr so breit erschien wie im ungeschädigten Chromosomen. Es sollte bedacht werden, dass die Falschfarbenbande nicht mehr komplett von der Software berechnet werden kann, wenn die Fragmentierung einen Abschnitt der Hybridisierung unterbricht. Bildverändernd bei der Falschfarben-

Darstellung waren auch technische Eingriffe beim Kontrast, bei der Helligkeit, der oberen und unteren Schwellenwerte der Fluoreszenz-Einzelfarben, bei der Objektschwelle oder bei automatischen Mechanismen zur Bildoptimierung. Es war jederzeit notwendig zu überprüfen, ob Maßnahmen zur Bildoptimierung nicht etwa in einer anderen Darstellungsart von ISIS unerwünschte Verschlechterungen nach sich zogen. Es ist bei mBAND möglich, dass an den Grenzen von translozierten oder invertierten Segmenten Bildinformationen zusammentreffen, die nicht mehr einwandfrei von der Software getrennt und auf die ordnungsgemäße Falschfarben-Darstellung umgerechnet werden können. Dennoch war es nach Anwendung der verschiedenen Darstellungsarten und deren Vergleich möglich, Bruchereignisse den einzelnen Banden zuzuordnen.

Fehler können auch bei mangelnder Hybridisierungsqualität entstehen. Widersprüchliche Falschfarbenübergänge oder Banden können die Folge sein (Abb. 12 g). Bildtechnische Eingriffe und Vergleiche der einzelnen Fluorochrome und deren Emissionsspektren führen meist zum richtigen Analyseergebnis. Die spektralen Intensitätsverläufe der Fluorochrome zeigen eindeutig, ob eine Bande von der Software falsch berechnet wurde, oder ob es sich im Falle einer Insertion oder Translokation um DAPI markierte Chromosomenabschnitte handelt (Abb. 12 g).

Bei der mBAND-Hybridisierung wird nur ein homologes Chromosomenpaar gegenüber allen anderen mit DAPI uniform gefärbten Chromosomen dargestellt (DAPI-Chromosomen). Dies ist von Vorteil, weil Anteile des gebänderten Chromosoms deutlich sichtbar sind, unabhängig von ihrer Position innerhalb der Metaphase. Von Nachteil ist, dass die CA mit der herkömmlichen Terminologie nur noch eingeschränkt beschrieben werden können. Bei einer Zelle, deren Chromosomen stark fragmentiert sind, lässt sich aufgrund der Färbung von nur einem Chromosom nicht mit Sicherheit sagen, ob eine Translokation reziprok ist oder nicht. Eine komplexe Translokation zwischen drei Chromosomen wäre ebenfalls denkbar.

Bei der mFISH-Hybridisierung bilden „Dichtegradienten“ der Fluorochrome den Umrechnungsfaktor für die mFISH typische Falschfarben-Darstellung. Das bedeutet bei einer Hybridisierung von gleichzeitig 23 Chromosomenpaaren, dass die spektrale Toleranz für Farb-Berechnungen sehr klein ist. Folglich können Artefakte innerhalb eines Chromosoms entstehen, die der farbigen Kennzeichnung (Abb. 13 a, b) der restlichen Chromosomen entsprechen. Auch hier hilft nur eine Überprüfung und Bestimmung des Chromosoms oder Fragments über die Fluorochrom-Einzelfarben.

Weil auch hier die Qualität der Hybridisierung für jedes Fluorochrom variieren kann, sind Kalibrierungen von Schwellenwerten und Farbsättigungen in der Software zwingend. Diese Bedingungen können dazu führen, dass mit mFISH kleinste Fragmente oder auch terminale Translokationen nicht immer deutlich genug sichtbar werden oder womöglich im farbigen „Hintergrundrauschen“ verschwinden (FOMINA *et al.*, 2000). Untersuchungen von Zellen, die mit dicht ionisierenden Strahlen bestrahlt wurden, sind somit schwierig. Dennoch sind die Ergebnisse für mBAND und mFISH bei bestimmten Fragestellungen (DIZ und Translokationen) sehr ähnlich. Eine weitere Überprüfung mit einer Pan-Zentromer-Färbung bestätigte diesen Befund.

4.2 CA in Chromosom 5

Für das Auftreten von CA werden verschiedene Theorien diskutiert. Mit molekulargenetischer Hilfe ist es in den letzten Jahren möglich geworden, zumindest teilweise die Mechanismen von DNA-Schädigungen und deren Reparatur aufzuklären (PFEIFFER *et al.*, 2000). Für physikalische Agenzien existieren zahlreiche Untersuchungen, die sich mit CA beschäftigen. Allerdings beschäftigten sich diese Arbeiten meist nur mit ionisierenden Strahlen, die wegen des Krebsrisikos für die Menschen auf der Erde von Bedeutung sind. Im Zuge des Fortschritts und der Erforschung des Weltraums haben Shuttle-Flüge in die oberen Schichten der Erdatmosphäre und Flüge in den erdnahen Weltraum zugenommen. Heute schon werden noch weitere Flüge, wie etwa zum Mars, geplant. Diese Entwicklungen machen auch die Erforschung von Strahlen notwendig, die erst im All auftreten.

Eisen als ein wesentliches Element im Universum ist im Weltraum auch in Form von schweren Ionen zu finden. Die Wirkungsweise der schweren Fe-Ionen konnte aber vor Ort im Weltraum bislang nicht geklärt werden. Stattdessen untersucht man schwere Ionen, die in speziellen Beschleunigungsanlagen auf der Erde erzeugt werden. Diese *in vitro* Untersuchungen können helfen, die spezifischen Effekte schwerer Fe-Ionen auf die DNA weiter aufzuklären. Man bekommt somit einen besseren Einblick in die Entstehung von Krebserkrankungen und kann möglicherweise in Zukunft das Krebsrisiko besser abschätzen.

Die Häufigkeit und die Komplexität der CA, die durch schwere Ionen ausgelöst werden, stellen einen interessanten Untersuchungsfaktor dar. Bereits vor etwa zehn Jahren wurde von BRENNER und SACHS (1994) postuliert, dass – im Vergleich zu

Röntgenstrahlen oder chemischen Agenzien - nach Bestrahlung mit dicht ionisierenden Strahlen (wie Neutronen, Alpha-Partikel oder schwere Ionen) bei der Auswertung der CA ein ungewöhnlich niedriger Quotient von DIZ zu Ringen berechnet werden könnte. Quotienten von verschiedenen CA wurden zwischenzeitlich kontrovers diskutiert und darauf getestet, ob sie als „Fingerabdruck“ für dicht ionisierende Strahlen in Frage kommen (BAUCHINGER und SCHMID, 1997; NAKAMURA *et al.*, 1998; LUCAS *et al.*, 1999). Ergebnisse aus diesem Gebiet liegen für schwere Ionen mit mFISH kaum und mit mBAND gar nicht vor. Weil mit diesen Methoden auch sehr komplexe CA erfasst werden können, wurde in der vorliegenden Untersuchung versucht, mit mBAND und mFISH einen solchen „Fingerabdruck“ im Genom nach Bestrahlungen mit schweren Fe-Ionen zu finden.

Zur Einschätzung der Wirkungsweise von Fe-Ionen ist es sinnvoll mit Daten anderer CA induzierenden Agenzien zu vergleichen, damit möglicherweise ein „Fingerabdruck“ herausgearbeitet werden kann. Zusätzlich zu den Daten dieser Arbeit für 1 Gy (500 MeV/n) und 4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n) werden Vergleichsdaten zu Röntgenstrahlen (4 Gy), Neutronenstrahlen (2 Gy) und des Restriktionsenzym AluI (30 Einheiten, Erkennungssequenz AG/CT), das in PBL sehr stark CA induziert, von JOHANNES *et al.* (2003) herangezogen. In deren Arbeit wurde ebenfalls nur Chromosom 5 mit mBAND analysiert.

4.2.1 Bandenlängen und interstitielle Fragmente

Zur Erfassung von Bruchereignissen mit räumlicher Nähe im Chromosom eignet sich besonders die Analyse von interstitiellen Chromosomensegmenten. Wegen der Bänderungstechnik bietet mBAND die Möglichkeit, Bruchereignisse in den Banden oder Bandenbereichen festzustellen und auf diese Weise die Nähe von Brüchen im Chromosom darzustellen. Für eine Analyse ist nicht nur die Position der Banden, sondern auch deren Länge ein wichtiger Faktor, weil so neue Erkenntnisse über die Länge der entstandenen Fragmente gewonnen werden können.

Wie in Punkt 2.7.6 bei „Material und Methoden“ beschrieben, sind die Bandenlängen unter anderem vom Kondensationsgrad des Chromosoms und von der Kalibrierung in ISIS abhängig. Sofern der Experimenttyp und der Falschfarben-Klassifikator unverändert bleiben, ist über ISIS eine relative Messung der Bandenlängen möglich. Weil die Längen in nur zwanzig Chromosomen ausgemessen wurden, ergeben sich teilweise recht hohe Schwankungen. Die Länge der interstitiellen Fragmente ist durch

Addition der einzelnen Bandenlängen erstellt worden und damit ebenfalls diesen Schwankungen unterworfen, ebenso wie die Zuordnung der Bruchereignisse zu einzelnen Banden.

Bei der Auswertung interstitieller Fragmente von stark fragmentierten Chromosomen lässt sich manchmal schwer sagen, was unter „interstitiell“ zu verstehen ist. Auch in der Literatur finden sich keine eindeutigen Erklärungen. Für den Fall, dass interstitielle Fragmente immer azentrisch sind, ist die Analyse eindeutig. Das gilt nicht für zentrische Chromosomenabschnitte. Würde ein Fragment lediglich das Zentromer und einen kleinen angrenzenden Bereich enthalten, läge ein zentrisches interstitielles Fragment vor. Das würde eine längenabhängige Definition bedeuten. Würde sich die Länge des genannten zentrischen Fragments zu den Telomeren hin erweitern, dann würde man schließlich von terminalen und nicht von interstitiellen Fragmenten sprechen. Eine Definition hinsichtlich der Länge ist ohnehin problematisch, weil die Chromosomen verschieden lang sind. Ein „interstitielles“ zentrisches Fragment eines großen Chromosoms könnte im relativen Vergleich zu einem kleinen Chromosom als zweifache terminale Translokation gewertet werden.

Für die Auswertung wurden unter „interstitielle Fragmente“ azentrische interstitielle Fragmente und solche zentrischen Fragmente zusammengefasst, die an den Telomeren einen Chromosomenstückverlust aufwiesen. Weil in mBAND keine interstitiellen Fragmente gefunden wurden, die länger als 75% der Gesamtchromosomenlänge waren, könnte man „interstitiell“, als „Chromosomenfragment mit zwei Bruchenden, das maximal 75% der Gesamtchromosomenlänge umfasst“ definieren. Eine Definition wie diese wäre möglicherweise nach entsprechender Überprüfung auf alle Chromosomen anwendbar.

Die interstitiellen Fragmente (Abb. 17) nach 4 Gy Fe-Ionen Bestrahlung können in Translokationen (Abb. 18) und interstitielle Deletionen (Abb. 19) unterteilt werden. Es zeigt sich, dass Fragmente aller gefundenen Längen bis 75% der Gesamtchromosomenlänge an Translokationen beteiligt sein können; bei interstitiellen Deletionen aber nur bis zu einer Länge von 40%. Es ist anzunehmen, dass wegen ihrer räumlichen Nähe die Bruchenden der kurzen interstitiellen Fragmente eher dazu tendieren, mit sich selbst zu fusionieren (etwa zu Ringen) als zu einem anderen, weiter entfernten Chromosom zu translozieren. Möglicherweise fusionieren interstitielle Fragmente mit mehr als 40% der Gesamtchromosomenlänge eher mit Nachbarchromosomen und nicht mit sich selbst. Die Entfernung der beiden

Bruchenden ist möglicherweise zu groß für die Bildung eines Ringchromosoms oder eines interstitiellen Fragments ohne jegliche Fusion. Ob dies auf Chromosomen jeder Größe zutrifft, sollte überprüft und mit absoluten Längen verglichen werden. Damit könnten weitere Einsichten in die Lage der Chromosomen im Zellkern und zur Chromosomendynamik geliefert werden.

4.2.2 Bruchereignisse

Für die lokale Schädigung der Chromosomen durch verschiedene Agenzien waren nicht nur die CA, sondern auch die Anzahl der entstandenen Chromosomenbrüche interessant. Die Häufigkeit von Brüchen im Chromosom könnte indirekt Auskunft geben über die Qualität der Ionisation auf DNA-Ebene.

Ein Vergleich der Bruchereignisse in Chromosom 5 zeigte, dass für 4 Gy Röntgenstrahlen, 2 Gy Neutronen und 1 Gy Fe-Ionen zu 70% Einzelbrüche pro Chromosom induziert wurden. 4 Gy Fe-Ionen und AluI induzierten dagegen nur noch etwa 52% Einzelbrüche. Berücksichtigt man das Auftreten komplexer Aberrationen sowie die Strahlenqualität, dann ist der niedrigere Wert zu erwarten gewesen. Vergleicht man die Verhältnisse der Anzahl von Brüchen, dann traten zwei Brüche gleichzeitig bei allen Agenzien in etwa 30% der Chromosomen auf. Drei Brüche wurden bei Röntgenstrahlen und Neutronen in weniger als 2% gefunden. Vier Brüche oder mehr traten bei Röntgenstrahlen nicht auf, liegen aber für die dicht und indirekt ionisierenden Neutronen bei etwa 2% der aberranten Chromosomen.

Bei 1 Gy Fe-Ionen weisen 6% der Chromosomen gleichzeitig drei Brüche und 3% vier Brüche oder mehr auf. Bei 4 Gy Fe-Ionen entstehen zu 12% drei Brüche pro Chromosom und zu 10% vier Brüche oder mehr. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit Werten für das Restriktionsenzym AluI (11% und 7%). Während also bei 4 Gy Fe-Ionen die relative Zahl der Einzelbrüche pro Chromosom abnimmt, steigen die Werte für Drei- und Vier-und-mehr-Brüche. Schon der Vergleich der Bruchereignisse zeigt den Unterschied zwischen Strahlenquantität und Strahlenqualität bei locker ionisierenden Strahlen, wie den Röntgenstrahlen, und dicht ionisierenden Strahlen, wie den Neutronen und schweren Ionen. Fe-Ionen bewirken sogar deutlich mehr Brüche gleichzeitig als Neutronen. Im Verhältnis induzierten 4 Gy Röntgenstrahlen und 2 Gy Neutronen etwa 0,25 Brüche pro Chromosom. Für AluI und 1 Gy Fe-Ionen war das Ergebnis mit 0,1 Brüchen niedriger. 4 Gy Fe-Ionen induzierten 0,57 Brüche pro Chromosom und waren somit in dieser Hinsicht am wirksamsten. Um zu überprüfen, ob

die Anzahl der Brüche pro Chromosom einer Poisson-Verteilung entspricht, wurden Dispersionsindizes berechnet. Mit Ausnahme von 1 Gy Fe-Ionen mit 200 MeV/n sind die Zahl der Brüche bei den übrigen Agenzien und Dosen überdispersiert. Im Vergleich zu den übrigen Daten ist für die Ausnahme bei 200 MeV/n eine statistische Unschärfe, wegen zu weniger untersuchter Zellen, wahrscheinlich. Die Dispersionsindizes für Röntgenstrahlen (1,3) sind am niedrigsten, gefolgt von Neutronen (1,4), Fe-Ionen (1,7 bei 1 Gy und 1,8 bei 4 Gy) und AluI (2,1). Für AluI kann der hohe Dispersionsindex mit der ungleich verteilten Aufnahme des Restriktionsenzym AluI mittels Elektroporation erklärt werden.

Ein Vergleich verschiedener Dosen von 0,5-4 Gy Fe-Ionen (500 MeV/n) in Abb. 21 zeigt interessante Ähnlichkeiten mit anderen Untersuchungen: WU *et al.* (2003) haben Untersuchungen mit 0,7 Gy und 3 Gy Fe-Ionen (200 MeV/n) mit Fibroblasten durchgeführt. Sie erhielten für beide Dosen ähnliche Verteilungen von einfachen und komplexen Interchangen sowie von vollständigen und unvollständigen Interchangen. Meist waren drei oder vier verschiedene Chromosomen an den CA beteiligt. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Häufigkeiten der ausgewerteten Bruchereignisse in der hier vorliegenden Untersuchung, dann wurden nach 0,5 Gy, 0,75 Gy und 1 Gy Fe-Ionen etwa 0,1 Brüche pro Chromosom festgestellt. Nach 3 Gy waren es 0,14 und nach 4 Gy 0,57 Brüche pro Chromosom. Wenn auch das Ergebnis für 3 Gy gegenüber 0,5 Gy bis 1 Gy etwas erhöht ist, so ist es dennoch annähernd vergleichbar. Für verschiedene Dosen könnte eine ähnliche Anzahl von Brüchen pro Chromosom auch auf ähnliche Verhältnisse von verschiedenen CA hinweisen.

Die Erhöhung der Brüche pro Chromosom auf 0,57 nach 4 Gy Fe-Ionen ist allerdings sehr stark und lässt sich nicht ausreichend erklären. Es bleibt zu diskutieren, ob für den großen Unterschied zwischen 3 Gy und 4 Gy möglicherweise eine Schwelle für unzureichende biologische Reparaturprozesse die Ursache sein könnte oder eine statistische Unschärfe aufgrund weniger analysierter Zellen. Die verschiedenen Energien von 200 MeV/n und 500 MeV/n, die bei WU *et al.* (2003) und in der vorliegenden Untersuchung benutzt wurden, scheinen durchaus vergleichbar zu sein. Dies trifft nach 0,5 Gy und 1 Gy für die Bruchverteilungen (Abb. 22) sowie für aberrante Zellen, Fragmente und Translokationen zu (Abb. 23). Vergleichbar waren auch die Anzahl der DIZ (Abb. 27). Die Fähigkeiten CA zu induzieren sind bei Strahlen mit hohem LET und diesen Energien offenbar gesättigt (DURANTE, 2002b). Es wäre durchaus möglich, dass bei weiterer Reduzierung der Dosis die Häufigkeit der Brüche

im Verhältnis zu aberranten Chromosomen ähnlich bleibt, wenn man annimmt, dass bei dieser Art von Strahlung DSB in unmittelbarer Nähe auftreten und so zu den beobachteten Brüchen im Chromosom führen (BAUCHINGER und SCHMIDT, 1998). Wenn also nach verschiedenen Dosen bei Bestrahlung mit schweren Ionen die Bruchverteilungen ähnlich sind, dann könnte das im Vergleich mit anderen Strahlenarten als Hinweis für dicht ionisierende Strahlen dienen.

Für weitergehende Untersuchungen war es interessant die Verteilung der Brüche im Chromosom zu überprüfen. Für eine bessere Auswertung wurden die Ergebnisse nach 0,5 Gy, 0,75 Gy, 1 Gy, 3 Gy und 4 Gy zusammengefasst. Isoliert man die Ergebnisse nach 4 Gy Bestrahlung, dann sieht die Verteilung ähnlich aus und zeigt in den Signifikanzen von erwarteten Brüchen zu beobachteten Brüchen kaum Unterschiede. In Relation zur Länge der beiden Chromosomenarme sind die beobachteten Bruchereignisse gleichmäßig verteilt. Allerdings gibt es innerhalb der Arme Häufungen von Brüchen, die bestimmten Banden zugeordnet werden konnten. Die erhöhte Zahl von Brüchen (Abb. 16) in Bande 3 und in den besonders kurzen Banden 13-14 zeigen ähnliche Ergebnisse zu Untersuchungen von TUCKER und SENFT (1994), die den größten Teil an Bruchereignissen etwa in der Mitte eines Chromosomenarmes von Chromosom 1,2 und 4 bestimmt haben.

Es bestätigte sich in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls, dass sehr wenige Brüche in Nähe der Telomere gefunden wurden. Allerdings waren es hier signifikant weniger Brüche. Es bleibt zu prüfen, ob dies bei Bestrahlung mit schweren Ionen möglicherweise spezifisch für Chromosom 5 sein könnte. Gegensätzlich zu den Ergebnissen von TUCKER und SENFT (1994) zeigt sich eine signifikante Anzahl Bruchereignisse in Nähe des Zentromers bei Bande 6 des p-Armes (Abb. 16). Die Schwankungen der gemessenen Bandenlänge könnten bei den kurzen Banden 13 und 14 zusammengefasst werden, um Messfehler auszugleichen. Eine Überprüfung hat aber gezeigt, dass die Signifikanz bei deren Zusammenfassung bestehen bleibt.

4.2.3 Interchange und Intrachange

Untersuchungen an menschlichen Lymphozyten und Fibroblasten mit Protonen, Kohlenstoffionen und 1 GeV/n Fe-Ionen von WU et al. (1997) zeigen, dass komplexe CA bei Strahlen mit hohem LET überwiegen. Dies kann für die eingesetzten Strahlen dieser Untersuchung bestätigt werden. Das Verhältnis komplexer zu einfachen Interchangen (C-Quotient) in Chromosom 5 wurde mit mBAND und mFISH untersucht.

Die Ergebnisse aus beiden Methoden zeigen keine signifikanten Unterschiede für einfache Interchange, jedoch sind die komplexen Interchange in mFISH erkennbar höher als in mBAND (Abb. 26). Dieses Ergebnis ist zu erwarten gewesen, weil etwa Austausche zwischen drei verschiedenen Chromosomen mit mFISH sichtbar sind, in mBAND aber nicht. Interessant wäre eine Untersuchung derjenigen komplexen Interchange mit mFISH, die mit mBAND als einfache Aberrationen erscheinen sowie der umgekehrte Fall, in welchem die Interchange zwischen homologen Chromosomen in mBAND dem Ergebnis der mFISH-Untersuchung gegenübergestellt werden. Auf diese Weise könnten zumindest statistisch die Einschränkungen beider Methoden in dieser Sache kompensiert werden. Der methodische Vergleich von mBAND und einer Pan-Zentromer-Färbung brachte keine signifikanten Unterschiede. Die Zahl von DIZ unter Beteiligung von Chromosom 5 konnte berechnet werden. Ein Vergleich mit der Auszählung in mBAND (Abb. 27) bestätigt, dass die manchmal schwer erkennbaren Zentromere in PCC richtig ausgewertet wurden (Abb. 14).

Ein Vergleich von einfachen und komplexen Interchanges (Abb. 28) mit Ergebnissen von JOHANNES *et al.* (2003) zeigt, dass Strahlen mit hohem LET deutlich mehr komplexe Interchange erzeugen als Röntgenstrahlen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass auch Röntgenstrahlen komplexe Aberrationen erzeugen können, was aber dosisabhängig ist. Bestrahlungen mit schweren Ionen sind wegen der Strahlenqualität in ihrer lokalen Wirkung eher dosisunabhängig. Ergebnisse aus Untersuchungen an den Chromosomen 1, 2 und 5 mit Alpha-Strahlen bestätigen die Zunahme komplexer CA für Insertionen (ANDERSON *et al.*, 2000). Vergleichende Ergebnisse mit Gamma-Strahlen und Alpha-Strahlen konnten eine LET-Abhängigkeit wiederum nicht deutlich bestätigen (BAUCHINGER und SCHMID, 1997). Der C-Quotient für 2 Gy Neutronen, 1 Gy Fe-Ionen und AluI (30 Einheiten) ist etwa doppelt so hoch wie für Röntgenstrahlen und etwa dreimal so hoch für 4 Gy Fe-Ionen im Vergleich zur gleichen Dosis Röntgenstrahlen. An diesem Vergleich sieht man deutlich die Wirkung von Quantität und Qualität der jeweiligen Strahlenart.

In einem Vergleich bei FOMINA *et al.* (2000) für 4 Gy Röntgenstrahlung liegt die Zahl der unvollständigen terminalen Interchange bei 21%, wenn man markierte Telomere unberücksichtigt lässt. Tatsächlich fällt aber dieses Ergebnis auf unter 5%, wenn translozierte Telomere zur Auswertung hinzugezogen werden und sich auf diese Weise ein großer Teil der einseitigen Translokationen als reziproke Translokationen herausstellt. Letztlich ändert dies nichts an der Zahl aller ausgewerteten Interchange. Es

bleibt aber zu überlegen, ob sich nicht die Ergebnisse von einfachen und komplexen Interchangen ändern.

Biophysikalische Modelle (BRENNER und SACHS, 1994; SACHS *et al.*, 1997b; OSTASHEVSKY, 2000; WU, 2001) postulieren, dass dicht ionisierende Strahlen einen größeren Anteil an intrachromosomalen Austausch und ein höheres Verhältnis von intra-arm (interstitielle Deletionen und parazentrische Inversionen) zu inter-arm (Ringe, perizentrische Inversionen) Intrachangen (G-Quotient) verursachen, als das bei locker ionisierenden Strahlen der Fall ist. Während Ringe in Giemsa gefärbten Präparaten sehr leicht zu erkennen sind, ist dies für stabile intrachromosomale Austausche, etwa Inversionen, und interstitielle Fragmente nicht möglich. Deswegen eignete sich für diese Untersuchung mBAND besonders gut. Die Annahmen der oben genannten Autoren basieren grundsätzlich darauf, dass mit erhöhter Wahrscheinlichkeit chromosomale Austausche entstehen, wenn zwei DSB nebeneinander auftreten (SACHS *et al.*, 1997a). Diese Ereignisse in unmittelbarer Nähe scheinen die Anzahl von Intrachangen gegenüber Interchange, und intra-arm gegenüber inter-arm Intrachangen zu erhöhen.

Die Anzahl der Intrachange in Chromosom 5 wurde mit der Zahl der Interchange verglichen. Bei den verwendeten Agenzien überwog die Anzahl an Interchangen. Der Quotient aus einfachen Interchangen zu Intrachangen (F-Quotient) reicht für alle Agenzien von 2,2 bis zu 5,3. Fe-Ionen liegen mit einer Dosis von 1 Gy bei einem Quotienten von 2,2 und für 4 Gy bei 4,6. Der höchste Wert von 5,3 ist bei den Neutronen festgestellt worden. Mit Bezug auf die Röntgenstrahlen (3,1) sind keine signifikanten Unterschiede vorhanden, weil dosisbedingt auch hier sehr viele Interchange zu erwarten sind. Im Vergleich zu den übrigen Agenzien sind nach Bestrahlung mit Fe-Ionen sehr viele terminale Deletionen vorhanden. Während bei Röntgenstrahlen und Neutronen deren Anzahl bei etwa 10 % liegt, sind es bei 1 Gy Fe-Ionen etwa 40% und bei 4 Gy etwa 25%. Allerdings findet man für 4 Gy Fe-Ionen mehr Interchange als für 1 Gy. Weil in Standardkulturen von PBL stark geschädigte Zellen die Metaphase oft nicht erreichen, findet man in G2-PCC nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und Kohlenstoffionen immer eine Erhöhung der Anzahl terminaler Deletionen (DURANTE *et al.*, 1999).

Der G-Quotient reicht von 1,6 bei 4 Gy Röntgenstrahlen bis zu 2,6 bei 4 Gy Fe-Ionen. Auch dieser Unterschied war nicht signifikant. Für AluI lag dieser Wert bei 1,4. Für einen Vergleich von 4 Gy Röntgenstrahlen, 2 Gy Neutronen, 1 Gy und 4 Gy

Schwerionen sowie AluI mit den ermittelten Quotienten wurden die Ergebnisse für 4 Gy Röntgenstrahlen auf 1 gesetzt und die Ergebnisse der übrigen Agenzien entsprechend umgerechnet. Schaut man sich die Berechnungen für verschiedene ionisierende Strahlen an (BAUCHINGER und SCHMIDT, 1998), dann kann angenommen werden, dass dicht ionisierende Strahlen, wie schwere Ionen, DSB dichter beieinander erzeugen als beispielsweise Röntgenstrahlen. Deswegen sollte der Anteil an Intrachangen gegenüber Interchangen, und intra-arm gegenüber inter-arm Ereignissen, erhöht sein. Biophysikalische Modelle können derzeit absolute Werte für die F-Quotienten und G-Quotienten vorhersagen, allerdings sind noch viele Annahmen bezüglich der Verteilung des Chromatins in der Interphase, der Interaktion paarweise auftretender DSB und der Bewegung chromosomaler Bereiche notwendig.

Direkte Messungen wurden auch mit Giemsa-Färbung (BAUCHINGER und SCHMIDT, 1998; SASAKI, 1999) oder mit chromosomenarm-spezifischen FISH-Sonden (SASAKI, 1999; NATARAJAN *et al.*, 1996) durchgeführt. Die mBAND-Technik erlaubt aber eine wesentlich differenziertere Betrachtung. Abgesehen von den absoluten Werten wird mit Hilfe biophysikalischer Modelle vorgeschlagen, dass bei Strahlung mit hohem LET die F-Quotienten abnehmen und die G-Quotienten zunehmen. Ein Vergleich der dargestellten Ergebnisse ergibt F-Quotienten zwischen 2.2 (1 Gy Fe-Ionen) und 5.3 (2 Gy Neutronen) und G-Quotienten zwischen 1.4 (AluI) und 2.6 (4 Gy Fe-Ionen). Wie bereits oben angemerkt, ist ein direkter Vergleich dieser Werte mit bereits veröffentlichten Ergebnissen problematisch, weil diese auf verschiedenen Methoden und Modellen mit unterschiedlichen Annahmen beruhen. Erstaunlicherweise zeigen die Ergebnisse im Vergleich, dass weder der F-Quotient noch der G-Quotient signifikant von der Strahlenqualität oder den DNA-brechenden Agenzien abhängt. Dies gilt zunächst nur für die hier dargestellten Strahlen und Agenzien. Weitere vergleichende Untersuchungen wären empfehlenswert.

Aktuelle biophysikalische Modellvorstellungen sollten die hier dargestellten Ergebnisse zukünftig mit einbeziehen. Mathematische Modelle zeigen, dass die Abhängigkeit des F-Quotienten von der Strahlenqualität reduziert ist, wenn die Bewegung der Interphasechromosomen so langsam ist, dass eine Interaktion zwischen deutlich getrennten Bruchenden nicht benachbarter Chromosomenarme unmöglich ist (BRENNER und SACHS, 1996). Tatsächlich können Modelle, die auf einem statischen Interphase-Zellkern beruhen, nicht die Abhängigkeit von LET und F-Quotient vorhersagen (SAVAGE und PAPWORTH, 1996). Bei einer schnelleren Bewegung der

Chromosomen in der Interphase wären höhere G-Quotienten anzunehmen als diejenigen, die gemessen wurden. Im Gegensatz dazu bestätigen Modelle, die auf einer langsamen Chromosomenbewegung basieren, die G-Quotienten, die hier mit schweren Ionen und den übrigen Mutagenzien gemessen wurden (SACHS *et al.*, 1997b). Insgesamt deuten die Ergebnisse also darauf hin, dass Interphasechromosomen sich langsam oder gar nicht bewegen. Dies stimmt mit direkten Messungen an bestrahlten Lymphozyten überein (LUCAS und CERVANTES, 2002).

Die Ergebnisse widersprechen Untersuchungen von HANDE *et al.* (2003), die in chronisch exponierten Plutoniumarbeitern ein erhöhtes Vorkommen von Intrachangen zu Interchangen gefunden haben. Wegen der langen Expositionsdauer der Plutoniumarbeiter könnte es möglich sein, dass die meisten Interchange, die von dicht ionisierender Strahlung hervorgerufen wurden, in der Zellteilung verloren gingen und deswegen nicht stabil waren. Das wiederum könnte lange Zeit nach der Bestrahlung zu einer scheinbaren Überhöhung der Anzahl von Intrachangen geführt haben. Allerdings sind die hier betrachteten *in vitro* Experimente, die im ersten Zellzyklus nach der Bestrahlung betrachtet werden, nicht uneingeschränkt übertragbar auf Knochenmarkszellen, die bei HANDE *et al.* (2003) *in vivo* untersucht wurden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen deutlich, dass der C-Quotient sehr stark von den eingesetzten chromosomenbrechenden Agenzien abhängt. Besonders bei dicht ionisierender Strahlung, wie bei schweren Ionen oder Neutronen, ist der C-Quotient erhöht. Allerdings scheint er für schwere Ionenstrahlung dosisabhängig zu sein. Frühere Untersuchungen an Lymphozyten, die mit zwei verschiedenen Dosen von Fe-Ionen (1 GeV/n) bestrahlt wurden, bestätigen das (DURANTE *et al.*, 2002a). Wegen der Dosisabhängigkeit ist der C-Quotient als Signatur oder „Fingerabdruck“ für dicht ionisierende Strahlen ungeeignet.

4.3 CA in PBL von Astronauten

Bei dem untersuchten Taxiflug zur Raumstation ISS war mit einer Ausnahme keine signifikante Schädigung der Chromosomen festzustellen. Aufgrund der relativ kurzen Aufenthaltsdauer von neun Tagen und einer Dosis von 0,5-1 mSv/Tag (SINCLAIR, 1984, 2000; DURANTE, persönliche Mitteilung) war keine signifikante Schädigung zu erwarten. Zu bedenken ist allerdings, dass Astronaut 2 an einer der letzten 20tägigen Missionen zur Raumstation MIR teilgenommen hat. Besonders bei

den „MIR-Astronauten“ sind in verschiedenen Studien signifikante Erhöhungen der CA gefunden worden (OBE *et al.*, 1997). Sollte bei diesem Astronauten Jahre vorher eine starke Schädigung der Chromosomen festgestellt worden sein, dann könnte die Erhöhung der CA bei der vorliegenden Untersuchung darauf beruhen. Medizinische Untersuchungen oder Arbeitseinsätze außerhalb der ISS sowie individuelle Parameter können das Ergebnis ebenfalls beeinflussen. Leider lagen darüber keine Angaben vor. Dass die Anzahl komplexer Aberrationen mit der Dauer des Weltraumaufenthaltes zunimmt, wie es GEORGE *et al.* (2001a) feststellte, konnte in dieser Untersuchung nicht bestätigt werden. Interchange und Intrachange wurden zu selten gefunden. In Relation zur Aufenthaltsdauer war die Strahlendosis im erdnahen Orbit mit 0,5-1 mSv offenbar zu gering, so dass die wenigen komplexen Aberrationen, die gefunden wurden, mit so starken statistischen Schwankungen behaftet sind, dass man nicht unterscheiden kann, ob sie von dicht ionisierenden Strahlen verursacht wurden oder ob sie spontan sind. Man sollte aber immer berücksichtigen, dass der Schwellenwert für einen Dosisnachweis bei 100-200 mSv liegt (IAEA, 2001).

Der Nachweis eines „Fingerabdruckes“ für dicht ionisierende Strahlen, wie für Fe-Ionen, ist *in vitro* und *in vivo* bei Astronauten weder über die komplexen CA noch über die Anzahl der Bruchereignisse pro Chromosom gegenwärtig möglich. Die Tatsache, dass es für DIZ spontane Aberrationswerte gibt (etwa 1 DIZ in 1000 Zellen), kann sicherlich auf komplexe Aberrationen erweitert werden. Eine Untersuchung der Spontanraten für komplexe CA fehlt aber bislang noch.

Es ist aber anzunehmen, dass das Auftreten komplexer CA im Vergleich zu den DIZ noch seltener ist. Eine Chromosomenuntersuchung von mehreren tausend Zellen mit mFISH oder mBAND würde diese Annahme vermutlich bestätigen. Unter Berücksichtigung solcher Ergebnisse wären die wenigen gefundenen komplexen Aberrationen bei Astronauten besser zu bewerten. Eine Alternative wäre, eine längere Dauer der Exposition im Weltraum einzubeziehen. Chromosomale Untersuchungen mit modernen Methoden für weiter entfernte Raumflüge, beispielsweise zum Mond oder Mars fehlen bislang. Neben der längeren Bestrahlungszeit kann in diesen Fällen auch die Strahlendosis und besonders die Strahlenenergie der schweren Ionen zunehmen (SIMPSON, 1983). Die Ergebnisse aus solchen Untersuchungen könnten dann mit Ergebnissen aus dem erdnahen Orbit in Beziehung gesetzt werden. Eventuell lassen sich dann auch realistische Abschätzungen hinsichtlich der Spontanraten komplexer Aberrationen berechnen.

5. Zusammenfassung

Für die Suche nach einem „Fingerabdruck“ für dicht ionisierende Strahlen im Weltraum, wie etwa schwere $^{56}\text{Fe}^{26+}$ -Ionen, in den Chromosomen der PBL von Astronauten, wurden verschiedene Verfahren der *in situ* Hybridisierung eingesetzt und auf ihren Einsatz überprüft (mBAND, mFISH, Pan-Zentromer-Färbung). Menschliche PBL wurden *in vitro* mit schweren Fe-Ionen mit Energien von 200 MeV/n und 500 MeV/n und verschiedenen Dosen zwischen 0,5 Gy und 4 Gy bestrahlt.

Unter der Annahme, dass dicht ionisierende Strahlen verstärkt komplexe CA induzieren, erfolgte die Suche nach dem „Fingerabdruck“ über die Verteilung komplexer CSA sowie von Bruchereignissen, interstitiellen Fragmenten und Fragmentgrößen. Vergleiche verschiedener Quotienten, beispielsweise von intra-arm zu inter-arm Intrachangen oder von einfachen zu komplexen Interchangen wurden für diese Untersuchungen herangezogen, weil sie physikalische Theorien über die Wirkungsweise von ionisierenden Strahlen mit verschiedenem LET in Relation zum Grad der Komplexität von CA berücksichtigen. Dafür ist eine Methode wie mBAND besonders gut geeignet. Allerdings sind vorhandene Systeme zur Protokollierung der CA bei mBAND ungenau, so dass ein neues Klassifizierungssystem entwickelt werden musste.

Die Verteilungen der Brüche pro Bande in Chromosom 5 bestätigt, mit Ausnahme der gehäuften Brüche in Nähe des Zentromers, die Ergebnisse aus den Untersuchungen anderer Autoren, die in der Mitte der Chromosomenarme menschlicher Chromosomen 1, 2 und 4 gehäuft Brüche fanden.

PBL, die mit schweren Fe-Ionen bestrahlt wurden, zeigen in chromosomalen Untersuchungen gehäuft interstitielle Fragmente mit Längen von bis zu 20% der Gesamtlänge von Chromosom 5. Liegt deren Länge über 75%, sind sie nur noch an Translokationen beteiligt, nicht aber an Deletionen. Interstitielle Fragmente verteilen sich über das gesamte Chromosom, sind aber gehäuft im q-Arm zu finden. Die Schädigung der Chromosomen hinsichtlich von ein- bis vierfachen Bruchereignissen ist für schwere Ionen bei einer Energie von 500 MeV/n ähnlich hoch und überdispersiert. Die Ergebnisse zeigen auch im Vergleich mit anderen Strahlenarten, dass bei schweren Fe-Ionen die Mehrfachbrüche zunehmen, während die der Einzelbrüche abnehmen. Dies ist bei locker ionisierenden Strahlen, wie den Röntgenstrahlen, und bei den indirekt und dicht ionisierenden Neutronen nicht der Fall. Allerdings ist dies

dosisabhängig. Für die verschiedenen Energien von Fe-Ionen bei 200 MeV/n und 500 MeV/n sind bei gleicher Dosis die Verteilungen der CA sehr ähnlich. Das bestätigt und ergänzt vorhandene Untersuchungen anderer Autoren. Weil es sich bei den untersuchten Chromosomen um G2-PCC handelt, findet man mehr terminale Deletionen als in C-Metaphasen. Zu Bedenken ist, dass eine zu hohe Dosis oder Energie zu einem „cell overkill“ führen kann und dann Resultate liefert, die zu niedrig sind. Hier wäre die Suche nach einer geeigneten Strahlendosis bei ausreichender Zahl untersuchter Zellen wichtig.

Es ist anzunehmen, dass in einem niedrigen Dosisbereich von bis zu 0,5 Gy oder bei chronischer Exposition die Ergebnisse deutlicher werden. Dabei muss wiederum die spontane Aberrationsrate berücksichtigt werden, die für komplexe CA noch nicht definiert ist, wie es beispielsweise für DIZ der Fall ist. Für derart gelagerte Untersuchungen wäre die Auswertung von mehr als tausend Zellen pro Proband in mBAND erforderlich.

Hybridisierungen mit mFISH und mBAND eignen sich demnach besser für kurzzeitige hohe Strahlendosen oder für chronische Expositionen, wie etwa bei Plutoniumarbeitern. Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass selbst mit FISH kein „Fingerabdruck“ über die Verteilung bestimmter CA zu bestimmen ist, falls keine Informationen bezüglich der Strahlenart oder Strahlendosis vorhanden sind. Es müsste noch weiter untersucht werden, ob möglicherweise die Anzahl der strukturellen Brüche pro Chromosom einen Hinweis auf dicht ionisierende Strahlen geben kann, wenn vorhandene Ergebnisse über die Verteilung von CA mit einbezogen werden.

Für Untersuchungen von PBL von Astronauten im erdnahen Orbit bleibt dies aber schwierig, weil im Weltraum die vorhandene Strahlung in Qualität und Quantität verschieden und schwer kalkulierbar ist. Eine Wiederholung von „Fingerabdruck“-Untersuchungen wäre bei sehr langen Flügen zum Mond oder Mars sinnvoll, weil dann erstmalig der tiefe Weltraum durchquert werden müsste, wo schwere Ionen nicht mehr unter dem Einfluss des Gravitationsfeldes der Erde stehen.

6. Literatur

ALEXANDRU, G., ZACHARIAE, W., SCHLEIFFER, A., NASMYTH, K. (1999). Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *EMBO J.* 18, 2707-2721.

ANDERSON, R. M., MARSDEN, S. J., WRIGHT, E. G., KADHIM, M. A., GOODHEAD, D. T., GRIFFIN, C. S. (2000). Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-LET alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.* 76, 31-42.

ANDERSON, R. M., MARSDEN, S. J., PAICE, S. J., BRISTOW, A. E., KADHIM, M. A., GRIFFIN, C. S., GOODHEAD, D. T. (2003). Transmissible and nontransmissible complex chromosome aberrations characterized by three-color and mFISH define a biomarker of exposure to high-LET alpha particles. *Radiat. Res.* 159, 40-48.

BAUCHINGER, M. (1995). Quantification of low-level radiation exposure by conventional chromosome aberration analysis. *Mutat. Res.* 339, 177-189.

BAUCHINGER, M., SCHMID, E. (1997). Is there reliable experimental evidence for a chromosomal "fingerprint" of exposure to densely ionizing radiation? *Radiat. Res.* 147, 506-510.

BAUCHINGER, M., SCHMID, E. (1998). LET dependence of yield ratios of radiation-induced intra- and interchromosomal aberrations in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 74, 17-25.

BAYRHUBER, H., KULL, U. (Hrsg., 1998). *Linder Biologie*. 21. Aufl. Schroedel Verlag im Bildungshaus Schroedel Diesterweg Bildungsmedien GmbH & Co KG, Hannover. 35

BENDER, M. A., GRIGGS, H. G., BEDFORD, J. S. (1974). Mechanisms of chromosomal aberration production. 3. Chemicals and ionizing radiation. *Mutat. Res.* 23, 197-212.

BONASSI, S., ABBONDANDOLO, A., CAMURRI, L., DAL PRA, L., DE FERRARI, M., DEGRASSI, F., FORNI, A., LAMBERTI, L., LANDO, C., PADOVANI, P. (1995). Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genet. Cytogenet.* 79, 133-135.

BONASSI, S., HAGMAR, L., STROMBERG, U., MONTAGUD, A. H., TINNERBERG, H., FORNI, A., HEIKKILA, P., WANDERS, S., WILHARDT, P., HANSTEEN, I. L., KNUDSEN, L. E., NORPPA, H. (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res.* 60, 1619-1625.

BRENNER, D. J., SACHS, R. K. (1994). Chromosomal "fingerprints" of prior exposure to densely ionizing radiation. *Radiat. Res.* 140, 134-142.

BRENNER, D. J., SACHS, R. K. (1996). Comments on "Comment on the ratio of chromosome-type dicentric interchanges to centric rings for track-clustered compared with random breaks" by Savage and Papworth (*Radiat. Res.* 146, 236-240, 1996). *Radiat. Res.* 146, 241-242.

BRENNER, D. J., OKLADNIKOVA, N., HANDE, P., BURAK, L., GEARD, C. R., AZIZOVA, T. (2001). Biomarkers specific to densely-ionising (high LET) radiations. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 97, 69-73.

CARSTAIRS, K. (1962). The human small lymphocyte - Its possible pluripotential quality. *Lancet*, 829-832.

CHUDOBA, I., PLESCH, A., LORCH, T., LEMKE, J., CLAUSSEN, U., SENGER, G. (1999). High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 84, 156-160.

COGGLE, J. E. (1983). *Biological Effects of Radiation*. 2. Edition. International Publications Service, Taylor & Francis Inc., New York.

CORNFORTH, M.N., BEDFORD, J.S. (1993). Ionizing Radiation Damage and Its Early Development in Chromosomes. In: *Advances in Radiation Biology*, vol. 17. DNA and Chromatin Damage Caused by Radiation, edited by J.T. Lett and W. K. Sinclair (San Diego: Academic), 423-496.

CORNFORTH, M. N. (2001). Analyzing radiation-induced complex chromosome rearrangements by combinatorial painting. *Radiat. Res.* 155, 643-659.

DURANTE, M., GEORGE, K., YANG, T. C. (1996). Biological dosimetry by interphase chromosome painting. *Radiat. Res.* 145, 53-60.

DURANTE, M., FURUSAWA, Y., GOTOH, E. (1998). A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in biodosimetry. *Int. J. Radiat. Biol.* 74, 457-462.

DURANTE, M., FURUSAWA, Y., MAJIMA, H., KAWATA, T., GOTOH, E. (1999). Association between G2-phase block and repair of radiation-induced chromosome fragments in human lymphocytes. *Radiat. Res.* 151, 670-676.

DURANTE, M., GEORGE, K., WU, H., CUCINOTTA, F. A. (2002a). Karyotypes of human lymphocytes exposed to high-energy iron ions. *Radiat. Res.* 158, 581-590.

DURANTE, M., GIALANELLA, G., GROSSI, G., PUGLIESE, M., SCAMPOLI, P., KAWATA, T., YASUDA, N., FURUSAWA, Y. (2002b). Influence of the shielding on the induction of chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed to high-energy iron ions. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 43, 107-S111.

Edwards A. A., Lloyd D. C., Purrot R. J. (1979). Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution. *Radiat. Environ. Biophys.* 16, 89-100

FERGUSON-SMITH, M. A. (1997). Genetic analysis by chromosome sorting and painting: phylogenetic and diagnostic applications. *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 253-265.

FOMINA, J., DARROUDI, F., BOEI, J. J., NATARAJAN, A. T. (2000). Discrimination between complete and incomplete chromosome exchanges in X-irradiated human lymphocytes using FISH with pan-centromeric and chromosome specific DNA probes in combination with telomeric PNA probe. *Int. J. Radiat. Biol.* 76, 807-813.

FRITZ-NIGGLI, H. (1997). *Strahlengefährdung/Strahlenschutz*. 4. Aufl., Verlag Hans Huber, Bern

GEORGE, K., DURANTE, M., WU, H., WILLINGHAM, V., BADHWAR, G., CUCINOTTA, F. A. (2001a). Chromosome aberrations in the blood lymphocytes of astronauts after space flight. *Radiat. Res.* 156, 731-738.

GEORGE, K., WU, H., WILLINGHAM, V., CUCINOTTA, F. A. (2001b). The effect of space radiation on the induction of chromosome damage. *Phys. Med.* 17 *Suppl. 1*, 222-225.

GOODHEAD, D. T. (1989). The initial physical damage produced by ionizing radiations. *Int. J. Radiat. Biol.* 56, 623-634.

GOSWAMI J.N., MCGUIRE R.E, REEDY R.C., LAL D., JHA R. (1988). Solar Flare and Alpha Particles During the Last Three Solar Cycles. *J. Geophys. Res.* A93, 7195.

GOTOH, E., ASAKAWA, Y., KOSAKA, H. (1995). Inhibition of protein serine/threonine phosphatases directly induces premature chromosome condensation in mammalian somatic cells. *Biomed. Res.* 16, 63-68.

GRECO, O., OBE, G., GIALANELLA, G., GROSSI, G., HORSTMANN, M., PUGLIESE, M., SCAMPOLI, P., VON RECKLINGHAUSEN, U., DURANTE, M. (2002). Chromosome damage in cosmonauts' lymphocytes detected by FISH painting. *Microgravity and Space Station Utilization* 3, 11-17.

GRIFFIN, C. S., MARSDEN, S. J., STEVENS, D. L., SIMPSON, P., SAVAGE, J. R. (1995). Frequencies of complex chromosome exchange aberrations induced by ²³⁸Pu alpha-particles and detected by fluorescence in situ hybridization using single chromosome-specific probes. *Int. J. Radiat. Biol.* 67, 431-439.

GUDOWSKA, I., ANDREO, P., SOBOLEVSKY, N. (2002). Secondary particle production in tissue-like and shielding materials for light and heavy ions calculated with the Monte-Carlo code SHIELD-HIT. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 43 *Suppl.*, 93-97.

HAGMAR, L., BROGGER, A., HANSTEEN, I. L., HEIM, S., HOGSTEDT, B., KNUDSEN, L., LAMBERT, B., LINNAINMAA, K., MITELMAN, F., NORDENSON, I. (1994). Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.* 54, 2919-2922.

HANDE, M. P., AZIZOVA, T. V., GEARD, C. R., BURAK, L. E., MITCHELL, C. R., KHOKHRYAKOV, V. F., VASILENKO, E. K., BRENNER, D. J. (2003). Past exposure to densely ionizing radiation leaves a unique permanent signature in the genome. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1162-1170.

HERRMANN, TH., BAUMANN, M. (1997). *Klinische Strahlenbiologie*. 3. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena.

HESS, F. V. (1913). Über den Ursprung der durchdringenden Strahlung. *Phys. Zeitschrift* 14, 610-617.

HORSTMANN, M., OBE, G. (2003). CABAND: Classification of Aberrations in Multicolor Banded Chromosomes. *Cytogenet. Gen. Res.* (im Druck)

IAEA (2001). *Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment*. Vienna: International Atomic Energy Agency.

ISCN 1995: an International System for Human Cytogenetic Nomenclature. (ed) Mitelman, F. (1995). S. Karger, Basel.

JOHANNES, C., CHUDоба, I., OBE, G. (1999). Analysis of X-ray-induced aberrations in human chromosome 5 using high-resolution multicolour banding FISH (mBAND). *Chrom. Res.* 7, 625-633.

JOHANNES, C., HORSTMANN, M., DURANTE, M., CHUDOBA, I., AND OBE, G. (2003). Chromosome intrachanges and interchanges detected by multicolor banding in lymphocytes: searching for clastogen signatures in the human genome. *Radiat. Res.* (eingereicht)

JOHNSON, R.L., BRENNER, D.J., NATH, J., TUCKER, J.D., GEARD, C.R. (1999). Review. Radiation induced breakpoint misrejoining in human chromosomes: random or non-random. *Int. J. Radiat. Biol.* 75, 131-141

JONES, L. A., GLEGG, S., EDWARDS, S., KENT, C., PEACOCK, J.H. (1995). The Relationship Between Cell Death and Residual Radiation Induced Damage. In: *Radiation Research 1885-1995, Congress Proceedings*, vol. 1., ed. Jung H., Streffer C. Würzburg: University Press, 380.

KAKAZU, N., BAR-AM, I., HADA, S., AGO, H., ABE, T. (2003). A new chromosome banding technique, spectral color banding (SCAN), for full characterization of chromosomal abnormalities. *Genes Chromosomes.Cancer* 37, 412-416.

LANGER, P. R., WALDROP, A. A., WARD, D. C. (1981). Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 78, 6633-6637.

LAU, Y. F., ARRIGHI, F. E. (1981). Studies of mammalian chromosome replication. II. Evidence for the existence of defined chromosome replicating units. *Chromosoma* 83, 721-741.

LENGAUER, C., SPEICHER, M. R., POPP, S., JAUCH, A., TANIWAKI, M., NAGARAJA, R., RIETHMAN, H. C., DONIS-KELLER, H., D'URSO, M., SCHLESSINGER, D. (1993). Chromosomal bar codes produced by multicolor fluorescence in situ hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes. *Hum. Mol. Genet.* 2, 505-512.

LIEHR, T., WEISE, A., HELLER, A., STARKE, H., MRASEK, K., KUECHLER, A., WEIER, H. U., CLAUSSEN, U. (2002). Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. *Cytogenet. Genome Res.* 97, 43-50.

LUCAS, J. N., AWA, A., STRAUME, T., POGGENSEE, M., KODAMA, Y., NAKANO, M., OHTAKI, K., WEIER, H. U., PINKEL, D., GRAY, J. (1992). Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 62, 53-63.

LUCAS, J. N., DENG, W., ORAM, S. W., HILL, F. S., DURANTE, M., GEORGE, K., WU, H., OWENS, C. L., YANG, T. (1999). Theoretical and experimental tests of a chromosomal fingerprint for densely ionizing radiation based on F ratios calculated from stable and unstable chromosome aberrations. *Radiat. Res.* 151, 85-91.

LUCAS, J. N., CERVANTES, E. (2002). Significant large-scale chromosome territory movement occurs as a result of mitosis, but not during interphase. *Int. J. Radiat. Biol.* 78, 449-455.

McClintock, B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *zea mays*. *Genetics* 26, 234-282.

METASYSTEMS GmbH. (2001). XCyte Lab Manual.

METASYSTEMS GmbH. (2003). XCyte Lab Manual.

MORTON, N. E. (1991). Parameters of the human genome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 7474-7476.

MÜLLER, S., ROCCHI, M., FERGUSON-SMITH, M. A., WIENBERG, J. (1997). Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization. *Hum. Genet.* 100, 271-278.

MÜLLER, S., O'BRIEN, P. C., FERGUSON-SMITH, M. A., WIENBERG, J. (1998). Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis. *Cytometry* 33, 445-452.

MÜLLER, S., WIENBERG, J. (2001). "Bar-coding" primate chromosomes: molecular cytogenetic screening for the ancestral hominoid karyotype. *Hum. Genet.* 109, 85-94.

NAKAMURA, N., TUCKER, J. D., BAUCHINGER, M., LITTLEFIELD, L. G., LLOYD, D. C., PRESTON, R. J., SASAKI, M. S., AWA, A. A., WOLFF, S. (1998). F values as cytogenetic fingerprints of prior exposure to different radiation qualities: prediction, reality and future. *Radiat. Res.* 150, 492-494.

NATARAJAN, A. T., BOEI, J. J., VERMEULEN, S., BALAJEE, A. S. (1996). Frequencies of X-ray induced pericentric inversions and centric rings in human blood lymphocytes detected by FISH using chromosome arm specific DNA libraries. *Mutat. Res.* 372, 1-7.

NATARAJAN, A. T., OBE, G. (1996). Radiation induced chromosomal aberrations. Introduction. *Mutat. Res.* 366, 65-67.

NATARAJAN, A. T., OBE, G. (1999). Biological Dosimetry of Absorbed Radiation Dose Based on the Frequencies of Chromosomal Aberrations in Human Lymphocytes. In: *Fundamentals for the Assessment of Risks from Environmental Radiation*, ed. C. Baumstark-Khan, S. Kozubeck, G. Horneck, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 179-168.

NCRP (2000). *Radiation Protection Guidance for Activities in Low-Earth Orbit*. National Council of Radiation Protection and Measurements. 132. Bethesda, MD.

NENNO, M., SCHUMANN, K., NAGL, W. (1994). Detection of rRNA and phaseolin genes on polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* by fluorescence in situ hybridization after pepsin pretreatment. *Genome* 37, 1018-1021.

NIKIFOROVA, M. N., STRINGER, J. R., BLOUGH, R., MEDVEDOVIC, M., FAGIN, J. A., NIKIFOROV, Y. E. (2000). Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science* 290, 138-141.

NOWELL, P. C. (1960). Phytohemagglutinin - An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20, 462-466.

OBE, G., JOHANNES, C., SCHULTE-FROHLINDE, D. (1992). DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* 7, 3-12.

OBE, G., JOHANNES, I., JOHANNES, C., HALLMAN, K., REITZ, G., FACIUS, R. (1997). Chromosomal aberrations in blood lymphocytes of astronauts after long-term space flights. *Int. J. Radiat. Biol.* 72, 727-734.

OBE, G., FACIUS, R., REITZ, G., JOHANNES, I., JOHANNES, C. (1999). Manned missions to Mars and chromosome damage. *Int. J. Radiat. Biol.* 75, 429-433.

OBE, G., PFEIFFER, P., SAVAGE, J. R., JOHANNES, C., GOEDECKE, W., JEPPESEN, P., NATARAJAN, A. T., MARTINEZ-LOPEZ, W., FOLLE, G. A., DRETS, M. E. (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat. Res.* 504, 17-36.

OSTASHEVSKY, J. Y. (2000). Higher-order structure of interphase chromosomes and radiation-induced chromosomal exchange aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.* 76, 1179-1187.

PANTELIAS, G. E., MAILLIE, H. D. (1984). The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry. *Radiat. Res.* 99, 140-150.

PARDUE, M. L., GALL, J. G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 64, 600-604.

PFEIFFER, P., GOEDECKE, W., OBE, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15, 289-302.

REITZ, G., HORNECK G., FACIUS, R., SCHÄFER, M. (1995). Results of space experiments. *Radiat. Environ. Biophys.* 34, 139-144.

REVELL, S. H. (1974). The breakage-and-reunion theory and the exchange theory for chromosomal aberrations induced by ionizing radiations. A short history. In: Lett, J.T., Adler, K. und Zelle, M. (ed.). *Advances in Radiation Biology*, Vol 4, Academic Press, New York.

SACHS, R. K., CHEN, A. M., BRENNER, D. J. (1997a). Review: proximity effects in the production of chromosome aberrations by ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 71, 1-19.

SACHS, R. K., BRENNER, D. J., CHEN, A. M., HAHNFELDT, P., HLATKY, L. R. (1997b). Intra-arm and interarm chromosome intrachanges: tools for probing the geometry and dynamics of chromatin. *Radiat. Res.* 148, 330-340.

SACHS, R. K., HLATKY, L. R., TRASK, B. J. (2000). Radiation-produced chromosome aberrations: colourful clues. *Trends Genet.* 16, 143-146.

SASAKI, M. S. (1999). F-value as a chromosomal fingerprint of the quality of radiation. *J. Radiat. Res.(Tokyo)* 40 Suppl., 165-171.

SAVAGE, J. R., PAPWORTH, D. G. (1973). The relationship of radiation-induced dicentric yield to chromosome arm number. *Mutat. Res.* 19, 139-143.

SAVAGE, J. R. (1976). Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.* 13, 103-122.

SAVAGE, J. R. (1991). Testing the Participation of Chromosomes in Structural Aberrations. In: *Eucaryotic Chromosomes:Structure and Funktional Aspects*, ed. Obe G., Sobti R.C.New Delhi: Narosa Press, 111-125.

SAVAGE, J. R., SIMPSON, P. (1994a). On the scoring of FISH-"painted" chromosome-type exchange aberrations. *Mutat. Res.* 307, 345-353.

SAVAGE, J. R., SIMPSON, P. J. (1994b). FISH "painting" patterns resulting from complex exchanges. *Mutat. Res.* 312, 51-60.

SAVAGE, J. R. (1996). Insight into sites. *Mutat. Res.* 366, 81-95.

SAVAGE, J. R., PAPWORTH, D. G. (1996). Comment on the ratio of chromosome-type dicentric interchanges to centric rings for track-clustered compared with random breaks. *Radiat. Res.* 146, 236-240.

SAVAGE, J. R., TUCKER, J. D. (1996). Nomenclature systems for FISH-painted chromosome aberrations. *Mutat. Res.* 366, 153-161.

SAX, K. (1938). Induction of X-rays of chromosomal aberrations in *Tradescantia* microspores. *Genetics* 25, 494-526.

SCHIMMERLING, W., WILSON, J. W., CUCINOTTA, F., KIM, M. H. (1998). Evaluation of risk from space radiation with high-energy heavy ion beams. *Phys. Med.* 14 Suppl. 1, 29-38.

SCHOLZ, M., KRAFT-WEYRATHER, W., RITTER, S., KRAFT, G. (1989). Cell cycle delays induced by heavy ion irradiation of synchronous mammalian cells. *Adv. Space Res.* 9, 91-96.

SCHOLZ, M., KRAFT-WEYRATHER, W., RITTER, S., KRAFT, G. (1994). Cell cycle delays induced by heavy ion irradiation of synchronous mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 66, 59-75.

SCHRÖCK, E., DU, M. S., VELDMAN, T., SCHOELL, B., WIENBERG, J., FERGUSON-SMITH, M. A., NING, Y., LEDBETTER, D. H., BAR-AM, I., SOENKSEN, D., GARINI, Y., RIED, T. (1996). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273, 494-497.

- SCHULTE-FROHLINDE, D. (1990). Die Chemie des zellulären Strahlentodes. *Chemie in unserer Zeit* 24, 37-44.
- SIMONSEN, L. C., WILSON, J. W., KIM, M. H., CUCINOTTA, F. A. (2000). Radiation exposure for human Mars exploration. *Health Phys.* 79, 515-525.
- SIMPSON, J. A. (1983). Elemental and isotopic composition of the galactic cosmic rays. *Ann. Rev. Part. Science* 33, 323.
- SINCLAIR, W. K. (1984). Radiation risk estimation and its application to human beings in space. *Adv. Space Res.* 4, 115-120.
- SINCLAIR, W. K. (2000). Dose limits for astronauts. *Health Phys.* 79, 585-590.
- SPEICHER, M. R., GWYN, B. S., WARD, D. C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat. Genet.* 12, 368-375.
- TUCKER, J. D., SENFT, J. R. (1994). Analysis of naturally occurring and radiation-induced breakpoint locations in human chromosomes 1, 2 and 4. *Radiat. Res.* 140, 31-36.
- TUCKER, J. D., MORGAN, W. F., AWA, A. A., BAUCHINGER, M., BLAKEY, D., CORNFORTH, M. N., LITTLEFIELD, L. G., NATARAJAN, A. T., SHASSERRE, C. (1995). PAINT: a proposed nomenclature for structural aberrations detected by whole chromosome painting. *Mutat. Res.* 347, 21-24.
- WATSON, J. D., CRICK, F. H. C. (1953). Molecular Structure of nucleic acids. *Nature*, 171, 737-738.
- WU, H., DURANTE, M., GEORGE, K., YANG, T. C. (1997). Induction of chromosome aberrations in human cells by charged particles. *Radiat. Res.* 148, 102-107.

WU, H. (2001). Probabilities of radiation-induced inter- and intrachromosomal exchanges and their dependence on the DNA content of the chromosome. *Radiat. Res.* *156*, 603-606.

WU, H., DURANTE, M., FURUSAWA, Y., GEORGE, K., KAWATA, T., CUCINOTTA, F. A. (2003). Truly Incomplete and Complex Exchanges in Prematurely Condensed Chromosomes of Human Fibroblasts Exposed In Vitro to Energetic Heavy Ions. *Radiat. Res.* *160*, 418-424.

YANG, T. C., GEORGE, K., JOHNSON, A. S., TAVAKOLI, A., DURANTE, M., FEDORENKO, B. S. (1997). Cytogenetic effects of space radiation in lymphocytes of MIR-18 crews. *Aviakosm. Ekolog. Med.* *31*, 8-14.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Günter Obe, der meine Arbeit betreute und mir mit zahlreichen Anregungen und steter Diskussionsbereitschaft zur Seite stand.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Genetik, die mich mit konstruktiver Kritik und Hilfsbereitschaft unterstützt haben.

Ausdrücklich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Marco Durante (Dipartimento di Scienze Fisiche, Università "Federico II" Monte S. Angelo, 80126 Napoli, Italien), der in Zusammenarbeit mit dem National Institute for Radiological Sciences (NIRS, Chiba, Japan) die mit schweren Eisenionen bestrahlten Zellen zur Verfügung gestellt hat und mit motivierenden Diskussionen zum Fortgang der Arbeit beigetragen hat.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Andrzej Wojcik (Institute of Chemistry and Nuclear Technology, Warschau, Polen) für die technische Anleitung und Diskussionsbereitschaft.

Teile dieser Arbeit wurden aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) durch das Deutsche Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. (DLR) unter dem Kennzeichen 50WB0030 („Chromosomenaberrationen in peripheren Lymphozyten von Astronauten“) gefördert.

Teile dieser Arbeit wurden aus Mitteln der Europäischen Union im Rahmen von INTAS unter dem Kennzeichen 99-00-214 („Chromosomal aberrations induced by space radiation: *in vivo* and *in vitro* studies by fluorescence *in situ* hybridisation“) gefördert.

Meinen Eltern danke ich für ihre langjährige Unterstützung.

8. Lebenslauf

Name Markus Horstmann

Geboren am 05.12.1968 in Essen

Schulbildung

1975 - 1979 Wilhelm-Busch-Grundschule in Ratingen-Hösel

1979 - 1988 Kopernikus-Gymnasium in Ratingen-Lintorf

Schulabschluss: Abitur

Ausbildung

1988 - 1996 Studium der Fächer Biologie und Sport für das Lehramt für die
Sekundarstufe I+II an der Universität-Gesamthochschule Essen

Hochschulabschluss: 1. Staatsexamen für das Lehramt für die
Sekundarstufe I+II für die Fächer
Biologie und Sport

1997 - 1999 Referendariat am Studienseminar Essen für das Lehramt für die
Sekundarstufe II

Abschluss: 2. Staatsexamen für das Lehramt für die
Sekundarstufe I+II für die Fächer Biologie und Sport

Berufstätigkeit

1999 - 2000 Lehrer i.A. an der Viktoriaschule in Essen (städt. Gymnasium)
für die Fächer Biologie und Sport in der Sekundarstufe I+II

Seit 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik des
Fachbereichs Bio- und Geowissenschaften, Landschafts-
architektur der Universität Duisburg-Essen (Campus Essen)
unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Günter Obe

Essen, den 06.10.2003